Lane Medical Library

Zur Kenntnis des Einflusses von Adenylsäuren auf gewisse enzymatische, speziell oxydative, Prozesse in Muskelextrakt

Von

Carl G. Holmberg

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität zu Lund)

(Mit 3 Figuren im Text)

Berlin und Leipzig 1933
WALTER DE GRUYTER & CO.
vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung – J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung – Georg Reimer – Karl J. Trübner – Veit & Comp.

Zur Kenntnis des Einflusses von Adenylsäuren auf gewisse enzymatische, speziell oxydative, Prozesse in Muskelextrakt

Von

Carl G. Holmberg

Med. lic., Ld.

Akademische Abhandlung

welche zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Lund im Hörsaal des Physiologischen Instituts Freitag den 1. Dezember 1933 um 10 Uhr v. m. öffentlich verteidigt wird

---

Lund 1933, Håkan Ohlssons boktryckeri

Zur Kenntnis des Einflusses von Adenylsäuren auf gewisse enzymatische, speziell oxydative, Prozesse in Muskelextrakt

Von

Carl G. Holmberg

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität zu Lund)

(Mit 3 Figuren im Text)

Berlin und Leipzig 1933
WALTER DE GRUYTER & CO.
vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung – J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung – Georg Reimer – Karl J. Trübner – Veit & Comp.

Diese Arbeit erscheint in
„*Skandinavisches Archiv für Physiologie*“. Bd. LXVIII. (1934)

DRUCK VON METZGER & WITTIG IN LEIPZIG

Vorwort.

In ungefähr zweijähriger Arbeit im Physiologischen Institut in Lund habe ich versucht, mir eine persönliche Auffassung über gewisse Fragen zu bilden, die das Co-Fermentproblem der Kohlehydratumsetzung betreffen.

Diese Fragen sind in den letzten Jahren großem Interesse begegnet. Intensive Arbeit in mehreren Laboratorien hat uns ein sehr großes Material experimenteller Fakta zur Verfügung gestellt.

Die veröffentlichten experimentellen Daten weisen jedoch äußerst zahlreiche Widersprüche auf, und dasselbe gilt natürlich in noch höherem Grade von den theoretischen Erörterungen, welche die verschiedenen Forscher auf Grund ihrer experimentellen Resultate angestellt haben.

Es galt für mich besonders, über die Frage Klarheit zu gewinnen, wie diese als Co-Fermente bezeichneten Substanzen (die Co-Zymase, die Adenosintriphosphorsäure usw.) die Dehydrierungsprozesse in Muskelextrakt beeinflussen. Die von mir in dieser Richtung ausgeführten Experimente haben zu einer Reihe von Resultaten geführt, die mir eine allgemeinere Reichweite zu haben scheinen, und ich habe daher auf der Basis dieser Resultate einige Theorien bezüglich der Wirkungsweise dieser Co-Fermente aufgestellt.

Diese Arbeit enthält eine Zusammenfassung meiner Versuchsresultate und der aus diesen gezogenen Schlußsätze.

Ich habe das Material auf folgende Weise disponiert: In zwei einleitenden Kapiteln wird zunächst eine kurzgefaßte Darstellung der bisher gewonnenen Resultate auf diesem Gebiet, sowie der Theorien, die eine stärkere Beachtung erfahren haben, gegeben. Meine eigenen Untersuchungen und die sich auf diese stützenden theoretischen Erörterungen habe ich in drei Kapiteln zusammengefaßt. Das erste enthält Erörterungen über die Umsetzung der Hexosediphosphorsäure in Muskelextrakt in Gegenwart verschiedener als Co-Ferment wirkender Substanzen, das zweite behandelt die Dehydrierung der Milchsäure und der Apfelsäure unter dem Einfluß derselben Substanzen. Im dritten Kapitel schließlich ist das experimentelle Material zusammengefaßt worden.

Es ist einleuchtend, daß bei zweijähriger experimenteller Arbeit das gesammelte Material einen recht erheblichen Umfang annimmt. Um jedoch die Darstellung nicht allzu umfangreich werden zu lassen, habe ich nur eine Reihe typischer Experimente zur Beleuchtung des im Text Abgehandelten aufgenommen. Hinter jedem solchen hier mitgeteilten Versuch liegen Serien gleichartiger Versuche, die teilweise unter mehr oder weniger variierenden Bedingungen alle dasselbe Hauptresultat ergeben haben. Im Text sind auch eine Reihe von Versuchsserien mit vollständig negativem Resultat erwähnt. Ich glaubte keine Beschreibung derselben geben zu brauchen, da sie, wenn ihre Planlegung nicht aus dem Text hervorgeht, vollständig analog den in der experimentellen Abteilung beschriebenen Versuchen ausgeführt worden sind.

Herrn Professor Dr. Thunberg möchte ich meinen ergebensten Dank aussprechen für das Wohlwollen und das Interesse, die er mir während der Arbeitsjahre im Physiologischen Institut erwiesen hat. Besonders habe ich ihm dafür zu danken, daß er mir bei der Beschaffung einer Reihe für meine Untersuchungen notwendiger, seltener Präparate geholfen hat, die bisher nur in geringen Mengen in Speziallaboratorien hergestellt werden.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch allen anderen danken, die mir durch Gaben oder persönlicher Hilfe meine Arbeit ermöglicht und erleichtert haben. Die Herren Professoren Szent-Györgyi und Myrbäck haben mir durch großzügige Gaben der von ihnen dargestellten Co-Fermente wertvolle Unterstützung geleistet. Herr Professor Ege bereitete mir die Möglichkeit, in seinem Laboratorium Adenosintriphosphorsäure darzustellen, wobei mir Herr Dr. Jacobsen seine sachkundige Hilfe zuteil werden ließ.

Auch Frau Margot Nilsson, sowie Frau Sonja Palmqvist sei für ihre wertvolle Hilfe bei den Versuchen gedankt.

Zur Kenntnis des Einflusses von Adenylsäuren auf gewisse enzymatische, speziell oxydative, Prozesse in Muskelextrakt.

Von

Carl G. Holmberg.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität zu Lund.)

(Mit 3 Figuren im Text.)

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Kurzer Bericht über die bedeutendsten modernen Theorien über die Alkohol- und Milchsäuregärung sowie der oxydativen Kohlehydratspaltung in der Muskelzelle 1
II. Bisherige Untersuchungen über die Beeinflussung des Zuckerabbaues durch Arsenat und Arsenit, Fluorid und Monobromazetat 28
III. Über die Spaltung von Hexosediphosphorsäure durch Muskelextrakt bei Anwesenheit eines Wasserstoffakzeptors 32
IV. Über die Oxydation von Milchsäure und Apfelsäure unter dem Einfluß von Muskelextrakt und feinverteilter Muskulatur 54
V. Experimentelles 59
Literatur 81

I. Kurzer Bericht über die bedeutendsten modernen Theorien über die Alkohol- und Milchsäuregärung sowie der oxydativen Kohlehydratspaltung in der Muskelzelle.

Man ist heute allgemein der Ansicht, daß die lebende Zelle den Energieinhalt des aus den Nahrungskohlehydraten freigemachten Hexosemoleküls ausnützt, indem sie dieses stufenweise in kleinere, energieärmere Moleküle spaltet. In bezug auf die verschiedenen Gärungstypen ist dies ohne weiteres klar, aber das Problem der oxydativen Kohlehydratspaltung hat sich als schwieriger lösbar erwiesen. Die auf Lavoisiers Entdeckungen gegründete Lehre, daß die biologischen Oxydationserscheinungen eine Form von direkter, langsamer Verbrennung, d. h.

eine synchrone und definitive Sättigung aller Affinitäten der Moleküle seien, hat eine große Macht über die Geister gehabt und hat dies auch heute noch. So gründet sich auf diese Lehre die Auffassung, der respiratorische Quotient, d. h. das Verhältnis zwischen der Menge gebildeter Kohlensäure und verbrauchten Sauerstoffs müsse bei der biologischen Kohlehydratoxydation gleich 1 sein.

Der alten Auffassung der biologischen Oxydation als einer direkten, langsamen Verbrennung steht nunmehr die Wieland-Thunbergsche Lehre gegenüber, daß die biologische Oxydation aus einer Serie von Dehydrierungsprozessen, die oft reversibel sind, bestehe. Die gebildete Kohlensäure stammt nicht von „verbranntem" Kohlenstoff, sondern sie hat ihren Ursprung in abgespalteten Carboxylgruppen. Die verbrauchte Sauerstoffmenge und die abgegebene Kohlensäuremenge sind zwei Faktoren ohne festen gegenseitigen Zusammenhang. Sie sind jede für sich von einem verwickelten Zusammenspiel zwischen einer Serie von Oxydations-, Reduktions- und Decarboxylierungsprozessen abhängig, die wir mit unseren gegenwärtigen Kenntnissen noch bei weitem nicht zu überblicken vermögen, und bei denen es sehr wohl möglich ist, daß eine intime Kuppelung zwischen Auf- und Abbauvorgängen bei verschiedenen Stoffgruppen existiert.

Die Wieland-Thunbergsche Oxydationstheorie hat sich als sehr fruchtbar erwiesen, und sie ist nunmehr in größerer oder geringerer Ausdehnung von den meisten Forschern, die sich mit hierhergehörigen Problemen beschäftigen, akzeptiert worden.

Wenn man von der alten Auffassung hinsichtlich einer vollständigen direkten Verbrennung absieht, so ist es möglich, die bisher bekannten biologischen Spaltungswege für Kohlehydrate in zwei Hauptgruppen einzuteilen:

1. Spaltungen, die mit einer Oxydation des Hexosemoleküls beginnen. Hierbei wird, wenn das Substrat Glykose ist, primär Glukonsäure oder möglicherweise in gewissen Fällen Glukuronsäure gebildet. Die Glukonsäure kann weiter angegriffen werden und zur Entstehung einer Serie von Produkten, darunter Zitronensäure, führen. Der enzymatische Verlauf bei diesem Spaltungstypus, der u. a. in der Leber vorkommt, ist von Müller, Bernhauer, Harrison u. a. studiert worden. Hier soll nicht über die Arbeiten dieser Forscher berichtet werden, da diese Arbeit sich in der Fortsetzung ausschließlich mit dem zweiten Spaltungstypus beschäftigten wird.

2. Spaltungen, die mit einer Teilung der Hexose in zwei Moleküle mit je drei Kohlenstoffatomen beginnen. Zu diesem Spaltungstypus gehören u. a. die Alkohol- und die Milchsäuregärung, sowie aller Wahrscheinlichkeit nach auch die in den Muskel- und Hefezellen vorkommende

Kohlehydratoxidation. Besonders dank der intensiven Arbeit, die in den letzten Jahrzehnten auf die Erforschung der Chemie der Alkoholgärung verwandt worden ist, haben wir nunmehr eine ziemlich eingehende Kenntnis über den Verlauf dieses Spaltungstypus.

Deshalb wird, obgleich diese Arbeit hauptsächlich Probleme behandelt, die sich auf die Kohlehydratspaltung in der Muskelzelle beziehen, hier auch eine kurze Darstellung unserer gegenwärtigen Kenntnisse über die Alkoholgärung gegeben.

Da in vielen Fällen immer noch verschiedene Auffassungen einander gegenüberstehen ohne daß es zu einer Entscheidung kommen kann, so erschien es natürlich, der Darstellung eine halb historische Form zu geben, derart, daß die Arbeiten und Theorien verschiedener Forscher jede für sich behandelt werden. Am Ende des Kapitels ist dann ein Versuch gemacht worden, in grob schematischer Tabellenform eine Zusammenfassung des Materials zu geben. Ein Blick auf diese Tabellen kann vielleicht das Lesen erleichtern, wenn der Text an einer Stelle weniger übersichtlich sein sollte.

Die Darstellung ist absichtlich kurz gehalten und befaßt sich nur mit den Grundzügen. Wer sich in das eine oder andere Detail besonders zu vertiefen wünscht, findet die hierzu nötigen Literaturhinweise am Ende des Buches, sowie auch Angaben über einige Übersichtsarbeiten neueren Datums, die beim Studium hierhergehöriger Fragen von Wert sein können.

Buchner.

Die ersten Voraussetzungen für die Forschungen der letzten Zeit über die Probleme der Alkoholgärung wurden von Buchner (1) geschaffen, als er im Jahre 1897 seine Methode zur Darstellung eines zellfreien Preßsaftes aus Hefe veröffentlichte, der das ganze Fermentsystem der Alkoholgärung enthielt, und also die Fähigkeit besaß, Zucker zu Alkohol und Kohlensäure zu vergären.

Buchners Preßsaft erbot beim Studium des Gärungsverlaufes zwei große Vorteile vor den lebenden Hefepilzen. Erstens war die Zellenmembran eliminiert, wodurch es möglich wurde, die Wirkung vieler Substanzen zu studieren, für die diese eine undurchdringliche Barriere gebildet hatte. Zweitens fiel das Zellenwachstum fort, das viele frühere Versuchsresultate getrübt hatte.

Das Arbeiten mit Buchners Preßsaft wurde unmittelbar mit großem Interesse von mehreren Laboratorien aufgegriffen, hatte aber anfangs meistens den Charakter einer Kritik. Man bezweifelte, daß es Buchner wirklich gelungen sei, einen zellenfreien Saft darzustellen, und versuchte, den Gärungseffekt als eine Wirkung überlebender Zellen und Zellensplitter zu erklären.

Harden, Young und Robison.

Die ersten positiven Resultate des Arbeitens mit Buchners Preßsaft hinsichtlich des eigentlichen Gärungsverlaufes kamen von England. Im Jahre 1904 veröffentlichten Harden und Young (2) eine Mitteilung, in der sie nachwiesen, daß der Preßsaft in zwei je für sich inaktive Fraktionen aufgeteilt werden kann, die zusammen die Fähigkeit besitzen, Zucker zu vergären. Die eine Fraktion ist thermolabil und hochmolekular, die andere passiert die Dialysemembran und ist ziemlich thermostabil. Die letztere Fraktion wurde von Harden und Young als Co-Ferment der Alkoholgärung bezeichnet.

Schon im nächsten Jahre kamen Harden und Young (1) mit einer neuen Entdeckung von vielleicht noch grundlegenderer Bedeutung. Im Jahre 1905 gelang es ihnen nämlich zu zeigen, daß Phosphorsäure während des Gärungsverlaufes an eine organische Verbindung gebunden wird. Diese Entdeckung wurde von Young (1) weiter verfolgt, der im Jahre 1909 zum erstenmal zeigen konnte, daß die entstandene Verbindung aller Wahrscheinlichkeit nach eine Hexosediphosphorsäure war.

Auf Grund quantitativer Arbeiten über die Phosphorsäurebindung und die parallel damit verlaufende Kohlensäureentwicklung stellten Harden und Young (4) im Jahre 1910 die bekannten Formeln auf, in denen sie ihre damalige Auffassung des Verlaufes der Alkoholgärung zusammenfaßten. Diese Formeln hatten folgendes Aussehen:

1. $2C_6H_{12}O_6 + 2PO_4HR_2 = 2CO_2 + 2C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O$.
2. $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2PO_4HR_2$.

Die Auffassung des Gärungsverlaufes, die diese Formeln repräsentieren, läßt sich in Worten folgendermaßen ausdrücken: Gleichzeitig damit, daß ein Hexosemolekül zu Alkohol und Kohlensäure abgebaut wird, wird ein anderes mit Phosphorsäure zu Hexosediphosphorsäure gepaart. Die so gebildete Hexosediphosphorsäure erfährt dann eine hydrolytische Spaltung unter Bildung von freier Hexose und freiem anorganischen Phosphat.

Die hauptsächliche experimentelle Unterlage für diese Formeln war die Beobachtung, daß die bei der Alkoholgärung gebildete Kohlensäuremenge der Menge veresterter Phosphorsäure äquivalent war.

Im Jahre 1914 kam ein komplizierendes Moment hinzu, indem es Harden und Robison (1) gelang, die Entstehung noch eines Phosphorsäureesters während des Gärungsverlaufes nachzuweisen. Dieser Ester wurde von Robison (1) eingehend untersucht und erwies sich als eine Hexosemonophosphorsäure. Da Harden und seine Mitarbeiter zu finden glaubten, daß auch unter den Verhältnissen, unter denen Hexosemonophosphorsäure angehäuft wurde, die veresterte Phosphorsäuremenge

der gebildeten Kohlensäuremenge äquivalent sei, ergänzten sie Hardens Gärungsformel vom Jahre 1910 mit zwei Supplementformeln, die ein Bild vom Verlauf der Bildung von Hexosemonophosphorsäure geben sollten:

1a) $3C_6H_{12}O_6 + 2PO_4HR_2 = 2C_6H_{11}O_5(PO_4R_2) + 2H_2O + 2CO_2 + 2C_2H_6O.$

2a) $C_6H_{11}O_5(PO_4R_2) + H_2O = C_6H_{12}O_6 + PO_4HR_2.$

Harden vertrat hierdurch die Auffassung, daß die Phosphorylierung als solche das Wesentliche sei. Damit ein Molekül Kohlensäure entstehen können soll, muß ein Molekül Phosphorsäure an Zucker gebunden werden. Er dachte sich hierbei die beiden Reaktionen, die Spaltung der Hexose, und die Phosphorylierung, in irgendeiner Weise „energetisch gekuppelt" in Analogie mit Meyerhofs Vorstellung von der Milchsäureoxydation und der Glykogensynthese.

Einige später zutage getretene Beobachtungen, teilweise aus Hardens eigenem Laboratorium, namentlich aber von dem holländischen Forscher Struyk (1), laut denen die Phosphorsäureveresterung und die Kohlensäurebildung unter gewissen Verhältnissen, besonders wenn der gebildete Ester eine Hexosemonophosphorsäure ist, nicht äquivalent sind, werden von Harden unerklärt gelassen.

Im Jahre 1928 gelang es Robison und Morgan (1), noch einen Phosphorsäureester zu isolieren, der unter gewissen Umständen ziemlich reichlich während des Gärungsverlaufes auftritt. Die teilhabende Kohlehydratkomponente ist in diesem Falle ein Disaccharid, und der fragliche Ester hat sich als eine Trehalosemonophosphorsäure herausgestellt.

Diese drei Kohlehydrat-Phosphorsäureester: Hexosediphosphorsäure, Hexosemonophosphorsäure und Trehalosemonophosphorsäure sind dann eingehenden Analysen unterzogen worden. So haben Robison und King (1, 2) zeigen können, daß die Hexosemonophosphorsäure, so wie sie während der Gärung entsteht, keine einheitliche Substanz, sondern eine Mischung von wenigstens zwei Estern ist, von denen der eine ein Aldo- und der andere ein Ketoester ist. Der Aldoester ist wahrscheinlich 6-Glukosephosphorsäure, während der Ketoester mit großer Wahrscheinlichkeit als eine Frukto-Furanose-6-Phosphorsäure anzusehen ist.

Die Hexosediphosphorsäure scheint einheitlich zu sein und ist laut Untersuchungen von u. a. Robison und Morgan (2) und Morgan (1) eine Frukto-Furanose-1-6-Diphosphorsäure.

Bezüglich der Konstitution der Trehalosemonophosphorsäure liegen noch keine definitiven Resultate vor.

In einem Artikel in „Ergebnisse der Enzymforschung", 1932, hält Harden (2) fortwährend in der Hauptsache an der Auffassung von der

Bedeutung der Phosphorylierung fest, die hier in Kürze angeführt worden ist. Er gibt jedoch nunmehr zu, daß neben diesem, von ihm als normal aufgefaßten Verlauf, auch eine Gärungsform vorkommt, bei der die Hexosediphosphorsäure die Rolle eines direkten Intermediärproduktes spielt. Der Grund hierfür ist folgender: Harden und seine Mitarbeiter hatten beobachtet, daß bei Versuchen mit Hefesaft bei Anwesenheit von anorganischem Phosphat die Gärungskurve ein typisches Aussehen hatte. Nachdem die Gärungsintensität zuerst schnell zugenommen hatte, hielt sie sich, solange noch freies Phosphat zugänglich war, konstant, sank aber, als die ganze freie Phosphorsäure verestert war, schnell auf einen niedrigen Wert, der dann beibehalten wurde. Die Lösung enthielt da Hexosediphosphorsäure. Harden und Young (3, 5) hatten ferner gefunden, daß, wenn man, nachdem vollständige Veresterung eingetreten war, kleine Mengen Arsenat oder Arsenit zusetzte, die Gärungsgeschwindigkeit zunahm und binnen kurzem wieder den ursprünglichen Optimalwert erreichte.

Diese Erscheinung wurde ursprünglich von Harden und Young in Übereinstimmung mit ihrer Theorie so gedeutet, daß das Arsenat und das Arsenit die Fähigkeit besaßen, die hydrolytische Spaltung der Hexosediphosphorsäure zu aktivieren. Hierdurch sollte von neuem genügend Phosphorsäure freigemacht werden, damit eine neue Veresterung mit darauffolgender Kohlensäure- und Alkoholbildung stattfinden könne. Diese Auffassung mußte Harden später aufgeben, da Macfarlane (1) zeigen konnte, daß die reine Hydrolyse von Hexosediphosphorsäure in Hefeextrakt, der das Vermögen zur Bildung von Alkohol verloren hatte, durch Arsenat nicht beschleunigt wird. Harden akzeptierte nun eine von Meyerhof (3) aufgestellte Theorie, nach der eine direkte Vergärung von Hexosediphosphorsäure möglich ist. Diese spezielle Vergärungsform soll sich dadurch auszeichnen, daß sie durch kleine Mengen Arsenat aktiviert wird.

Harden und seine Schüler haben hauptsächlich mit der Phosphorylierung und damit zusammenhängenden Problemen gearbeitet. In bezug auf spätere Stadien der Alkoholgärung schließt sich Harden im wesentlichen Neubergs Auffassung an, über die weiter unten berichtet werden soll. Harden und Young haben dem von ihnen entdeckten Co-Ferment kein eingehenderes Studium gewidmet. Harden (2) ist der Ansicht, daß es immer noch unmöglich sei, das Stadium in der Abbaukette, in dem es seine Wirkung ausübt, näher zu präzisieren.

Meyerhof und seine Schule.

Meyerhof teilt mit Embden die Ehre, die großen Übereinstimmungen zwischen dem Kohlehydratstoffwechsel in der Muskelzelle und

in der Hefe nachgewiesen zu haben. Sein erster Einsatz auf diesem Gebiete war der Nachweis, daß das Co-Ferment der Alkoholgärung oder eine damit nahe verwandte Verbindung auch in der Muskulatur vorkam. Meyerhof (1, 2) zeigte nämlich, daß ein aus Muskulatur dargestellter Extrakt, der die Fähigkeit besaß, Glykogen zu Milchsäure zu vergären, in gleicher Weise wie das Fermentsystem der Alkoholgärung in einen thermolabilen, hochmolekularen und einen thermostabilen, dialysablen Faktor aufgeteilt werden konnte, die jeder für sich inaktiv waren. Der thermostabile Faktor aus Hefe konnte dazu verwendet werden, die Milchsäuregärung und den oxydativen Kohlehydratabbau in Muskelextrakt zu reaktivieren, der von seinem thermostabilen Faktor befreit worden war; andererseits konnte der thermostabile Faktor aus Muskulatur zum Reaktivieren der Alkoholgärung in Co-fermentfreien Hefepräparaten verwendet werden.

Auch ein anderer Berührungspunkt zwischen dem Kohlehydratstoffwechsel der Hefe und der Muskelzelle ist von Meyerhof nachgewiesen worden. Wenn ein Muskelextrakt stehen gelassen wird, so verliert er schnell das Vermögen, Glukose anzugreifen, während der Abbau von Glykogen zu Milchsäure unbeeinflußt bleibt. Es ist Meyerhof (3) gelungen, aus Hefe ein Präparat von Enzymnatur darzustellen, das einen solchen Muskelextrakt so zu reaktivieren vermag, daß dieser wieder das Vermögen erhält, Glukose anzugreifen. Das Präparat wird von Meyerhof Hexokinase genannt, und er ist der Ansicht, daß es wirkt, indem es die Glukose in einen leicht esterifizierbaren Zucker umwandelt.

Seither haben Meyerhof und seine Mitarbeiter viel Arbeit auf Versuche verwendet, um Klarheit über die Prozesse, die der Milchsäurebildung und dem oxydativen Kohlehydratabbau in der Muskelzelle zugrunde liegen, zu gewinnen. Sie sind hierbei zu der Auffassung gekommen, daß die Milchsäuregärung, wie sie in der Muskulatur vor sich geht, und die Alkoholgärung, bis zu dem Stadium, wo die Kohlenstoffkette der Hexose gesprengt wird, als zwei nahezu identische Prozesse zu betrachten sind.

In seiner 1930 erschienenen Monographie „Die chemischen Vorgänge im Muskel“ legt Meyerhof (4) seine Auffassung des Gärungsverlaufes bei der Alkoholgärung in folgenden Formeln vor:

I. a) $C_6H_{12}O_6 + R_2HPO_4 = C_6H_{11}O_5(PO_4R_2)^* + H_2O$.
b) $2C_6H_{11}O_5(PO_4R_2)^* = 2CO_2 + 2C_2H_6O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$.
c) $C_6H_{11}O_5(PO_4R_2)^* = C_6H_{11}O_5(PO_4R_2)$ (Robisons Ester).
d) $C_6H_{11}O_5(PO_4R_2) + R_2HPO_4 = C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + H_2O$.

II. a) $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O = 2CO_2 + 2C_2H_6O + 2R_2HPO_4$.
b) $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2R_2HPO_4$.

Der mit * bezeichnete Ester ist nicht Robisons Ester, sondern eine hypothetische, labile Hexosemonophosphorsäure, die Meyerhof sich als während des Gärungsverlaufes entstanden denkt. Robisons Ester betrachtet Meyerhof als ein Stabilisierungsprodukt dieser Hexosemonophosphorsäure.

Meyerhofs Formeln unterscheiden sich, wie ersichtlich, von Hardens und Youngs dadurch, daß ein Hexose-Phosphorsäureester als ein obligatorisches Zwischenprodukt auftritt. Dieser Ester kann entweder ein Mono- oder ein Diester sein, aber Meyerhof ist der Ansicht, daß der von ihm angenommenen labilen Hexosemonophorphorsäure die hauptsächliche physiologische Bedeutung zukommt. Zwei Moleküle dieser labilen Hexosemonophosphorsäure sollen derart miteinander reagieren, daß das eine sein Phosphorsäureradikal an das andere verliert. Hierbei entsteht ein Molekül Hexosediphosphorsäure und ein Molekül einer labilen Hexose, welches letztere in zwei Moleküle mit dreigliedrigen Kohlenstoffketten zerfällt. Die Hexosediphosphorsäure kann entweder, wie Harden ursprünglich annahm, durch Hydrolyse in ihre Komponenten gespalten oder auch direkt vergoren werden. Meyerhof nimmt an, daß die Hexosediphosphorsäuregärung sich von der normalen Hexosemonophosphorsäuregärung dadurch unterscheidet, daß sie 1. langsamer verläuft, 2. schon bei geringeren Co-Fermentkonzentrationen stattfindet und 3. durch kleine Mengen von Arsenat spezifisch aktiviert wird [siehe Meyerhof (3)].

Meyerhofs Theorien gründen sich zum großen Teil auf seine Erfahrungen bezüglich der Kohlehydratspaltung in Muskelextrakt, die er mit der Alkoholgärung bis zu dem Punkte, wo die Kohlenstoffkette der Hexose gesprengt wird, als analog betrachtet. Er ist der Ansicht, daß die Bedeutung der Phosphorylierung darin liegt, daß sie die Hexose für diese Sprengung vorbereiten soll, und daß also ein Hexosephosphorsäureester als Zwischenprodukt auftreten muß. Da er von dem Satze ausgeht, daß ein Zwischenprodukt wenigstens mit der gleichen Geschwindigkeit umgesetzt werden muß wie das Anfangsprodukt, so glaubt er Harden-Youngs Hexosediphosphorsäure ausschließen zu können, da sich herausstellt, daß diese in vielen Fällen bedeutend langsamer als nicht phosphorylierter Zucker gespalten wird. Der von Robison isolierte Monoester schien anfangs die obenerwähnte Forderung zu erfüllen, aber später haben u. a. Neuberg und Kobel (1, 2) gezeigt, daß auch dieser Ester schlechter als nicht phosphorylierter Zucker vergoren wird. Meyerhof hat daher seine Zuflucht zu einem hypothetischen Monoester nehmen müssen, den er für so labil hält, daß er nicht isoliert werden kann. Es wird angenommen, daß dieser Ester später, sofern er nicht unmittelbar gespalten wird, zu Robisons Ester stabilisiert werden kann.

Da sich herausstellte, daß in einigen Fällen Muskelextrakt, der das Vermögen, Glykogen und Robisons Ester anzugreifen, verloren hatte, noch das Vermögen besaß, Milchsäure aus Hexosediphosphorsäure zu bilden, ergänzte Meyerhof seine Theorie mit der Annahme, daß auch die Hexosediphosphorsäure eine Milchsäuregärung ohne vorhergehende Hydrolyse erfahren kann. Er nahm hierbei an, daß die Extrakte, die das Vermögen zum Spalten von Glykogen und Robisons Ester verloren hatten, dadurch charakterisiert werden, daß ihr Gehalt an Co-Ferment erheblich vermindert sei. Die restierende Hexosediphosphorsäuregärung sollte also auch bei sehr kleinen Co-Fermentkonzentrationen stattfinden (Meyerhof war anfangs der Ansicht, daß sie ganz ohne Co-Ferment vor sich gehen könne).

Meyerhofs ursprüngliche Einstellung zum Co-Fermentproblem, daß er es nämlich für wahrscheinlich hielt, daß das Co-Ferment der Alkoholgärung, das Co-Ferment der Milchsäuregärung und das Oxydations-Co-Ferment (Meyerhofs „Atmungskörper") identisch seien, hat sich während der letzten Jahre bedeutend verändert. Hierzu haben in hohem Grade Lohmanns Arbeiten beigetragen. Lohmann (1, 3, 5, 6, 7, 10) glaubt gezeigt zu haben, daß das Co-Ferment der Milchsäuregärung aus drei Komponenten bestehe, nämlich Adenosintriphosphorsäure, Mg-Ion und Orthophosphat [siehe auch Meyerhof und Lohmann (2), sowie Meyerhof, Lohmann und Meyer].

Die Adenosintriphosphorsäure besteht laut Lohmann aus einem Molekül Muskeladenylsäure, die zwei Phosphorsäurereste addiert hat. Diese Phosphorsäurereste werden dadurch charakterisiert, daß sie sich beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren leicht abspalten lassen, wobei freies Orthophosphat gebildet wird. Da auch anorganisches Pyrophosphat beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren leicht zu Orthophosphat gespalten wird, war Lohmann ursprünglich der Ansicht, daß die Adenosintriphosphorsäure eine Muskeladenylsäure war, die Pyrophosphat addiert hatte. Hieraus leitet sich die Bezeichnung Adenylpyrophosphorsäure ab.

Nun haben von Euler und Myrbäck (6, 7, 8), sowie Myrbäck und von Euler (1, 2) und Myrbäck, von Euler und Hellström (1, 2) in Eulers Laboratorium zeigen können, daß das Co-Ferment der Alkoholgärung als wesentlichen Bestandteil eine Adenylsäure, die Co-Zymase, enthält, die jedoch nicht mit der Muskeladenylsäure identisch ist, und außerdem ist von von Euler und Nilsson (4) und von von Euler, Nilsson und Auhagen (1) gezeigt worden, daß diese Co-Zymase in Übereinstimmung mit Lohmanns Adenosintriphosphorsäure von Mg-Ionen in ihrer Wirkung unterstützt wird (siehe auch Myrbäck).

Meyerhof und seine Mitarbeiter sind daher bei der Auffassung geblieben, daß das Co-Fermentkomplex der Milchsäure- und der Alkoholgärung so gleichartig sind, daß sie innerhalb gewisser Grenzen einander ersetzen können, daß aber die Verschiedenheit der Adenylsäurekomponente wahrscheinlich auch einen gewissen Unterschied in der Funktion bedingt.

In bezug auf den oxydativen Kohlehydratabbau in der Muskulatur scheint Meyerhof seine Auffassung von der Bedeutung eines „Atmungskörpers" von ähnlicher Zusammensetzung wie die hier beschriebenen Co-Fermente aufgegeben zu haben. Der stimulierende Einfluß von Co-Fermentpräparaten aus Hefe auf die Oxydation in Muskelextrakt glaubt er durch den Gehalt dieser Präparate an Bernsteinsäure erklären zu können, die bekanntlich durch die Muskelzelle leicht oxydiert wird.

Meyerhofs Einstellung zum Oxydationsproblem wird nunmehr durch seine große Theorie von der Bedeutung der „Muskelatmung" beherrscht. Diese Theorie läuft bekanntlich darauf hinaus, daß nur ein Teil ($^1/_3$ bis $^1/_6$) der bei dem Abbau der Kohlehydrate gebildeten Milchsäure vollständig verbrannt wird, während die hierdurch freigemachte Energie teilweise durch „energetische Kuppelung" der Reaktionen dazu verwendet wird, aus dem Rückstand Glykogen zu resynthetisieren. (Die sog. Pasteursche Reaktion.)

Bezüglich der chemischen Unterlage für diese Theorie sind Meyerhofs Angaben ziemlich unbestimmt. Zeitweise scheint er angenommen zu haben, daß die ganze gebildete Milchsäure resynthetisiert wird, während die notwendige Energie durch eine direkte vollständige Verbrennung von Hexosemolekülen erhalten wird. Diese Verbrennung würde unter dem Einfluß von Warburgs Atmungsferment erfolgen und also von der Milchsäuregärung ganz verschieden sein.

Nunmehr scheinen jedoch Meyerhof und Lohmann (10), ein hervorragender Vertreter der Meyerhofschen Schule, die Auffassung zu akzeptieren, daß ein Teil der gebildeten Milchsäure verbrannt wird.

Nach dem nunmehr von Meyerhof eingenommenen Standpunkt existieren also wenigstens zwei verschiedene Co-Fermente für den biologischen Zuckerabbau in der Hefe- und Muskelzelle, die beide zu der Gruppe der Adenylsäuren gehören (wenn Szent-Györgyis später zu besprechende Oxydations Oxydations-Co-Ferment, deren Existenz wenigstens von Lohmann nicht verneint wird, mitgerechnet wird, sogar drei).

Es ist von Interesse zu sehen, wie sich Meyerhof und Lohmann die Funktion des von ihnen speziell studierten Co-Fermentsystems für die Milchsäuregärung vorstellen. Zu Beginn kann man feststellen, daß diese Autoren sich das Mg-Ion und die Adenosintriphosphorsäure als direkt bei ein und demselben chemischen Prozeß zusammenwirkend

vorstellen, nämlich bei der Bildung von Meyerhofs labilem Monoester [siehe Lohmann (10)]. Sie haben ferner beobachtet, daß die Co-Zymase und die Muskeladenylsäure unter gewissen Umständen die Adenosintriphosphorsäure ersetzen können, wobei diese Stoffe eine Phosphorylierung zu Adenosintriphosphorsäure oder, was die Co-Zymase betrifft, vielleicht zu einer anderen Adenylpolyphosphorsäure erfahren [siehe Meyerhof und Lohmann (3), Lohmann (7)]. Eine ähnliche Phosphorylierung ist übrigens bezüglich der Muskeladenylsäure früher von Lehnartz nachgewiesen worden.

Lohmann (10) drückt seine Auffassung hinsichtlich der Bedeutung dieser Reaktion folgendermaßen aus: „Nach dieser Anschauung wirken Adenylsäure und Co-Zymase bei der Milchsäurebildung erst nach ihrer Umwandlung zu einer höher phosphorylierten Verbindung." Er fährt fort: „Meyerhof und Lohmann sehen in diesem Aufbau und Abbau der Adenylpyrophosphorsäure die Möglichkeit zur Erklärung der Phosphorylierung der Kohlenhydrate."

Die zur Synthese von Adenosintriphosphorsäure aus Adenylsäure und Phosphat erforderliche Energie, etwa 25000 cal per Mol, denkt sich Lohmann als durch die Milchsäurebildung erhalten, aber den Mechanismus dieser hypothetischen Reaktion hat er noch nicht klarlegen können.

Bei der Spaltung von Adenosintriphosphorsäure soll laut Meyerhof und Lohmann (1) das freigemachte Phosphat unter Bildung von Kreatinphosphorsäure auf Kreatin überführt werden können.

Was die Spaltung der Hexose in Moleküle mit dreigliedrigen Kohlenstoffketten betrifft, hat sich Meyerhof früher, ebenso wie Harden, Neubergs Theorie angeschlossen. Vor einiger Zeit hat er indessen in einigen Artikeln [siehe Meyerhof und Kiessling, Meyerhof und McEachern, Meyerhof (5)] im Anschluß an eine Veröffentlichung von Embden, Deuticke und Kraft (1) anfangs dieses Jahres, die neue Auffassung dieser Verfasser bestätigt, daß die primären Spaltungsprodukte Triosephosphorsäuren seien und nicht, wie Neuberg angenommen hatte, Methylglyoxal.

Da Embdens neue Theorie sich auf die Annahme stützt, daß die Hexosediphosphorsäure ein obligatorisches Zwischenprodukt sei, bedeutet dies eine vollständige Umlegung des ganzen früheren Abbauschemas von Meyerhof. In seinem letzten Artikel [Meyerhof (5)] berichtet Meyerhof über einige Befunde Lohmanns, nach denen im Muskelextrakt ein enzymatisches Gleichgewicht zwischen den Aldo- und den Ketokomponenten des Robisonesters herbeigeführt wird. Dies ist wahrscheinlich als eine Grablegung des labilen Meyerhofesters und ein Übergang zu der neuen Phosphorylierungstheorie von Ohle (siehe später)

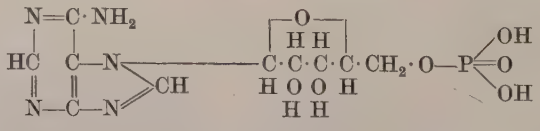
anzusehen. In demselben Artikel wird in einige Abbauschemata die Hexosediphosphorsäure als Zwischenprodukt aufgenommen. Im Text wird aber auch die Auffassung ausgesprochen, daß die Hexosediphosphorsäure als wahrer Katalysator bei der Glukosegärung wirkt.

Embden und seine Schule.

Embden, Griesbach und Schmitz zeigten 1914, daß die Hexosediphosphorsäure von Muskelpreßsaft unter Bildung von Milchsäure und freiem Phosphat gespalten wird. Hierdurch bekam der Gedanke, daß der Kohlehydratstoffwechsel in der Muskelzelle in ähnlicher Weise verlaufe wie die Alkoholgärung, seine erste experimentelle Stütze. Embden zog den Schlußsatz, daß im Muskel eine Form von Hexosediphosphorsäure vorkommen müsse, und diese Säure nannte er Lactacidogen. 1924 gelang es Embden und Zimmermann (1), aus Muskelpreßsaft, der mit Kaliumfluorid vergiftet war, eine Hexosediphosphorsäure zu isolieren, die mit der aus Hefe dargestellten identisch zu sein schien. Bei einem späteren Versuch, wobei keine Fluoridvergiftung zur Anwendung kam, erhielten Embden und Zimmermann (2) eine Hexosemonophosphorsäure, die große Ähnlichkeiten mit Robisons Ester zeigte. Beide diese Ester wurden von Embden ursprünglich Lactacidogen genannt, und hierdurch entstand eine Verwirrung, die zur Folge hatte, daß Embdens Terminologie nicht akzeptiert wurde.

Während der folgenden Jahre haben sich Embden und seine Mitarbeiter viel mit der von Embden und Zimmermann (2) aus Muskulatur isolierten Muskeladenylsäure beschäftigt, deren enger Zusammenhang mit Lohmanns Adenosintriphosphorsäure früher hervorgehoben worden ist. Bei diesen Arbeiten ist das Hauptgewicht auf die enzymatische Desaminierung dieser Substanz in der Muskulatur gelegt worden. Laut Embden hat nämlich gerade die Freimachung von Ammoniak eine direkte Bedeutung für das Hervorrufen der Muskelkontraktion.

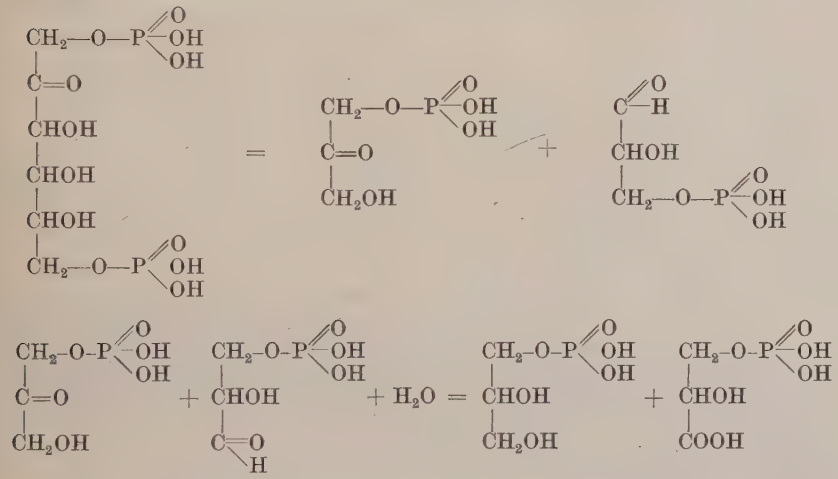
Ich gebe hier die Strukturformel der Muskeladenylsäure so, wie sie jetzt von Klimek und Parnas (1) angegeben wird:



Kurz vor seinem Tode konnte Embden indessen noch einmal die Frage des Kohlehydratstoffwechsels der Muskelzelle aufnehmen. In einer Mitteilung in einem Februarheft der „Klinischen Wochenschrift" haben nämlich Embden, Deuticke und Kraft die Resultate einiger Versuche mitgeteilt, die zeigen, daß fluoridvergifteter Muskelpreßsaft

aus Glykogen außer Hexosediphosphorsäure einen Monophosphorsäureester der l-Glyzerinsäure bildet. Dieser Ester wird auch, und in noch höherem Grade, aus zugesetzter Hexosediphosphorsäure gebildet. Außer Fluoridvergiftung begünstigt auch ein Zusatz von Oxalat oder Laktat die Entstehung der fraglichen Substanz.

Embden und seine Mitarbeiter ziehen aus diesen Versuchen den Schlußsatz, daß die Hexosediphosphorsäure als ein normales Zwischenprodukt bei der Kohlehydratspaltung zu betrachten ist und daß die Spaltung derselben zur Bildung von zwei Triosephosphorsäureestern führt. Aus diesen primär entstandenen Estern, Dioxyazetonphosphorsäure und Glyzerinaldehydphosphorsäure, sollen dann durch eine Cannizaroreaktion äquivalente Mengen des früher erwähnten Glyzerinsäureesters und der Glyzerinphosphorsäure gebildet werden.



Die von dieser Theorie geforderte Glyzerinphosphorsäure haben Embden und seine Mitarbeiter nicht isolieren können, aber sie teilen mit, daß sie eine gute Stütze für die Annahme ihres Vorkommens darin haben, daß ein gleichzeitiger Zusatz von Glyzerinsäurephosphorsäure und Glyzerinphosphorsäure zu einem Muskelextrakt eine intensive Milchsäurebildung auslöst, während die Milchsäurebildung aus jeder der beiden Substanzen für sich ziemlich träge erfolgt. (Übrigens behaupten Meyerhof und McEachern (1) in ihrer früher zitierten Arbeit, daß sie die Bildung von Glyzerinphosphorsäure in Muskelextrakt haben zeigen können.)

Da Embden und seine Mitarbeiter zeigen konnten, daß die Glyzerinsäurephosphorsäure unter dem Einfluß eines in der Muskulatur vorkommenden Enzyms durch Abspalten von Phosphorsäure direkt in

Brenztraubensäure umgelagert wird, haben sie in bezug auf die späteren Stadien der Milchsäuregärung folgende Theorie aufgestellt: Nachdem aus Hexosediphosphorsäure Glyzerinphosphorsäure und Glyzerinsäurephosphorsäure gebildet worden sind, verliert die Glyzerinsäurephosphorsäure ihren Phosphorsäurerest und geht in Brenztraubensäure über. Dann reagieren ein Molekül Brenztraubensäure und ein Molekül Glyzerinphosphorsäure miteinander derart, daß die Glyzerinphosphorsäure zu Glyzerinaldehydphosphorsäure oxydiert (dehydriert) und die Brenztraubensäure zu Milchsäure reduziert (hydriert) wird. Wenn in dieser Weise zwei Moleküle Milchsäure und zwei Moleküle Glyzerinaldehydphosphorsäure entstanden sind, können die gebildeten Glyzerinaldehydphosphorsäuremoleküle miteinander zu Glyzerinsäurephosphorsäure und Glyzerinphosphorsäure dismutieren, wonach die Reaktion wie oben beschrieben weitergeht. Man kann sich auch vorstellen, daß die Glyzerinphosphorsäure zu Dioxyacetonphosphorsäure dehydriert wird, und daß, anstatt zu dismutieren, diese Moleküle sich zu Hexosediphosphorsäure kondensieren. Am Prinzip wird dadurch nichts verändert.

Embden und seine Mitarbeiter glauben hierdurch einen Weg für die Milchsäuregärung gefunden zu haben, der besser mit den physiologischen Verhältnissen übereinstimmt als der von Neuberg angegebene.[1]

Neuberg und seine Schule.

Neuberg und seine Schüler haben sich besonders der Erforschung der späteren Stadien der Alkohol- und Milchsäuregärung gewidmet. Auch in bezug auf die Phosphorylierung und damit zusammenhängender Probleme haben sie jedoch Resultate von großem Interesse mitgeteilt. So hat Neuberg (2) gezeigt, daß man durch partielle Säurehydrolyse von Harden-Youngs-Ester einen Monoester vom Ketotypus erhalten kann. Dieser Ester hat die Bezeichnung „Neubergs Ester" erhalten, und es scheint viel dafür zu sprechen, daß er mit dem in Robisons Ester eingehenden Ketoester identisch ist. Neuberg und Kobel (1, 2) haben ferner Untersuchungen über die Vergärungsgeschwindigkeit verschiedener Hexosephosphorsäureester angestellt und sind dabei zu dem Schlußsatz gekommen, daß sämtliche langsamer als nicht phosphorylierter Zucker vergoren werden.

Trotz einzelner Äußerungen, die darauf hindeuten können, daß Neuberg die Hexosediphosphorsäure als ein obligatorisches Zwischenprodukt bei der Gärung betrachtet, scheint es, als ob er sich im großen und ganzen Meyerhofs ursprünglicher Auffassung des Phosphory-

[1] Neuerdings ist auch von verschiedenen Seiten die gute Vergärbarkeit der Glyzerinaldehydphosphorsäure nachgewiesen (siehe z. B. Smythe und Gerischer, *Biochem. Zeitschr.* 1933. Bd. CCLX. S. 414).

lierungsverlaufes anschließe. An mehreren Stellen bestreitet er, daß die Hexosediphosphorsäure überhaupt ein physiologisches Produkt sein könne [siehe z. B. Neuberg und Leibowitz (1) und Neuberg und Kobel (4)].

Neuberg scheint sich nicht Meyerhofs und Hardens Auffassung anzuschließen, daß der Einfluß von Arsenat auf den Gärungsprozeß auf einer Beschleunigung der Hexosediphosphorsäurevergärung beruhe. Er glaubt nämlich in Übereinstimmung mit Hardens früherer Ansicht gezeigt zu haben, daß Arsenat auf ein hydrolytisches Enzym, das Hexosediphosphorsäure spaltet, aktivierend wirkt, so daß freies Phosphat und Neubergs Ester gebildet werden. Laut Neuberg und Leibowitz (2) soll auch ein anderes hydrolytisches Enzym existieren, welches Hexosediphosphorsäure unter Bildung von Robisons Ester spaltet. Dieses Enzym soll für eine Arsenataktivierung unempfindlich sein.

Veibel (1) hat 1931 aus Neubergs Laboratorium eine interessante Arbeit über die Entstehung von verschiedenen Phosphorsäureestern während der Gärung veröffentlicht. Er hat dort gezeigt, daß der Monoester, Robisons Ester, während des ersten Abschnittes der Gärung vorherrschend ist, um dann allmählich für Harden-Youngs Ester Platz zu machen. Dies scheint ihm mit Meyerhofs Auffassung gut vereinbar zu sein, daß Robisons Ester, oder der Monoester, von dem er laut Meyerhof ein Stabilisierungsprodukt ist, zuerst gebildet werde, und daß die Hexosediphosphorsäure ein späteres Reaktionsprodukt darstelle. Auch von Eulers und Nilssons, sowie Kluyvers ziemlich gleichartige Theorien lassen sich gut mit Veibels Beobachtungen in Einklang bringen.

Neubergs epochemachende Arbeit über die späteren Stadien des Kohlehydratabbaues stützt sich auf seine Beobachtungen, daß Methylglyoxal, Brenztraubensäure und Acetaldehyd mit verschiedenen Methoden aus gärendem Material isoliert werden können. Hierzu kommt der Nachweis, daß die Überführung von Methylglyoxal in Milchsäure eine in der Welt der Organismen weit verbreitete Reaktion ist [siehe Neuberg und Kobel (3, 5), Neuberg und Reinfurth, Neuberg (1)].

Acetaldehyd kann während der Gärung durch die sog. „Abfangverfahren" aufgesammelt werden, d. h. Methoden die darauf ausgehen, der gärenden Mischung einen Stoff zuzusetzen, der sich mit der gesuchten Substanz zu einer beständigen Verbindung vereinigt. So kann der Acetaldehyd u. a. dadurch isoliert werden, daß man die Gärung in Gegenwart von Bisulfit, Semicarbazid oder Thiosemicarbazid stattfinden läßt.

Methylglyoxal und Brenztraubensäure können laut Neuberg nach diesem Prinzip nicht isoliert werden. Durch Vergären eines Überschusses von Hexosediphosphorsäure mit einer geringen Menge Hefe unter Zusatz von Toluol ist es aber Neuberg und Kobel (3) gelungen,

Methylglyoxal zu isolieren. Wenn sie etwas stärkere Hefekonzentrationen verwendeten, konnten Neuberg und Kobel (5) mit derselben Methode auch Brenztraubensäure isolieren.

Daß die Brenztraubensäure und der Acetaldehyd Zwischenprodukte bei der Alkoholgärung sind, wird des weiteren durch Beobachtungen bestätigt, die zeigen, daß sie durch das Fermentsystem der Hefe angegriffen werden. Dies hat dagegen nicht für synthetisch dargestelltes Methylglyoxal gezeigt werden können, und Neuberg nimmt daher an, daß das intermediär auftretende Methylglyoxal in einer speziellen, leicht dehydrierbaren Form entsteht.

Neubergs Auffassung des Verlaufes bei der Alkoholgärung kann durch folgende Formeln wiedergegeben werden (hierbei wird von der Phosphorylierung abgesehen).

1. $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3 \cdot CO(OH) \cdot CH(OH)$.

Die Hexose wird gespalten und führt zur Entstehung von zwei Molekülen Methylglyoxal (hier in Hydratform angegeben).

2. $2CH_3 \cdot CO(OH) \cdot CH(OH) = CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CH_2 \cdot OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH$.

Während des ersten Abschnittes der Gärung erfolgt in dieser Weise eine Dismutation zwischen zwei Methylglyoxalhydratmolekülen, und es werden also äquivalente Mengen Brenztraubensäure und Glyzerin gebildet.

3. $CH_3 \cdot CO \cdot COOH = CH_3 \cdot COH + CO_2$.

Unter dem Einfluß eines spezifischen, in der Hefe vorkommenden Enzyms, der Carboxylase, spaltet die Brenztraubensäure ein Molekül Kohlensäure ab und geht in Acetaldehyd über.

4. $CH_3 \cdot CO(OH) \cdot CH(OH) + CH_3 \cdot COH = CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CH_3 \cdot CH_2(OH)$.

Sobald Acetaldehyd zu entstehen beginnt, wird die einfache Dismutation zwischen zwei Methylglyoxalmolekülen durch eine gemischte Dismutation zwischen einem Molekül Methylglyoxal und einem Molekül Acetaldehyd ersetzt. Der Acetaldehyd wird hierbei zu Äthylalkohol reduziert. Die Reaktion kann also ohne Anhäufung von Zwischenprodukten glatt verlaufen. (Wenn der Acetaldehyd „abgefangen" wird, setzt die Dismutation nach 2. fort, und es entsteht also Glyzerin.)

Es hat sich herausgestellt, daß dieses Schema für viele experimentelle Beobachtungen gut paßt. Die größte Schwäche liegt natürlich darin, daß es nicht gelungen ist eine Vergärung von zugesetztem Methylglyoxal zu erzielen. In letzter Zeit hat jedoch Neuberg hervorgehoben, daß Methylglyoxal unter Bedingungen, die als physiologisch bezeichnet

werden können, spontan zu Brenztraubensäure oxydiert wird [siehe Neuberg und Kobel (6)]. Dies stimmt gut überein mit von mir früher veröffentlichten Beobachtungen bei der Methylenblaureduktion [siehe Holmberg (1)]. Das p_H, bei dem die Reaktion mit nennenswerter Geschwindigkeit verläuft, liegt jedoch so weit auf der alkalischen Seite, daß es in den Hefepilzen kaum verwirklicht sein dürfte; von dem Zelleninhalt derselben nimmt man nämlich an, daß er eine ziemlich saure Reaktion hat. Die alkalische Reaktion könnte also im Modellversuch vielleicht nur eine Umlagerung von Methylglyoxal in einer oxydablen Form ermöglichen, was in der Zelle auf andere Weise geschehen müßte (siehe im übrigen Kap. V, Versuch 31).

Neuberg und Kobel (7) haben auch neulich im Anschluß an die früher erwähnten Untersuchungen von Embden und seiner Mitarbeiter zeigen können, daß Hefe ebenso wie Muskelextrakt Glyzerinsäurephosphorsäure in Brenztraubensäure überführen kann.

Die Annahme von Neuberg, daß die Milchsäurebildung dadurch stattfinde, daß das primär gebildete Methylglyoxal von einem spezifischen Ferment, der Ketonaldehydmutase oder Glyoxalase, angegriffen wird, ist in letzter Zeit in Zweifel gezogen worden. So hat Lohmann (8) nachgewiesen, daß die Glyoxalase nur bei Anwesenheit von Glutathion fungiert, während die Milchsäurebildung aus Glykogen auch möglich ist, wenn kein Glutathion anwesend ist.

Neuberg hat die Co-Fermentfrage nicht in ihren Einzelheiten bearbeitet. Er scheint der Auffassung zu sein, daß das Co-Ferment, das bei der Alkoholgärung wirksam ist, zwei Angriffspunkte hat: 1. bei der Phosphorylierung und 2. bei der weiteren Umsetzung von Methylglyoxal.

Von Euler und seine Schule.

Das größte Verdienst bei der Erforschung des Harden-Youngschen Co-Ferments für die Alkoholgärung kommt von Euler und seinen Schülern zu. Die während der Jahre um 1920 sehr aktuelle Frage nach dem Vorkommen eines oder mehrerer Zuwachsvitamine scheint von Eulers Interesse für dieses Co-Ferment stimuliert zu haben. In einer Serie von Arbeiten aus den Jahren 1921 bis 1924 weisen von Euler und seine Schüler nach, daß das Harden-Youngsche Co-Ferment — von ihnen Co-Zymase genannt — mit keinem von diesen Zuwachsfaktoren identisch ist. Die Wirkung desselben ist an das Fermentsystem gebunden und vom Vorkommen lebender Zellen unabhängig.

Die Wirkung der Co-Zymase wurde 1924 von von Euler und Myrbäck (1, 3) in jenen Teil des Gärungsverlaufes verlegt, welcher der Bildung des Harden-Youngschen Esters vorausgeht. Zu diesem

Zeitpunkte zweifelten sie, ob die Co-Zymase nicht eine Co-Phosphatese sei oder ob sie vielleicht in einen Prozeß eingriffe, der noch früher als die Phosphorylierung stattfand. (Der Begriff Phosphatese stammt von von Euler und bezeichnet ein Enzym, das eine Phosphorylierung herbeiführt. Seine Berechtigung ist in Frage gestellt worden, da man im allgemeinen der Ansicht ist, daß diese Fermente reversible Prozesse katalysieren und also der alte Phosphatasebegriff ausreichend sein würde.)

Bei ihren Arbeiten über das Problem der Alkoholgärung haben von Euler und seine Mitarbeiter nur in geringerem Umfange Buchners Preßsaft verwendet. Sie haben statt dessen sog. Trockenhefepräparate benutzt. (Die Darstellung von Fermentpräparaten aus getrockneter Hefe stammt ursprünglich von Lebedev (1), der 1911 eine Methode zur Darstellung einer Fermentlösung durch Extraktion von Trockenhefe mit Wasser veröffentlicht hat.)

1921 zeigten von Euler und Myrbäck (2), daß Trockenhefe, dargestellt aus schwedischer Unterhefe, durch Auswaschen vollständig von Co-Zymase befreit werden konnte, ohne gleichzeitig den thermolabilen Teil ihres Fermentsystems zu verlieren. Andere Hefesorten, namentlich Oberhefe, hielten dagegen das Co-Ferment fest gebunden, eine Erscheinung, die einige unvereinbare Angaben von Forschern erklärte, die mit verschiedenem Fermentmaterial gearbeitet hatten.

Auf die Möglichkeit, aus getrockneter Unterhefe ein Co-zymasefreies Fermentpräparat darzustellen, gründete man nun eine biologische Methode zur quantitativen Bestimmung von Co-Zymase, die große Bedeutung erhielt, als man später daran ging, die fragliche Substanz zu isolieren.

Durch die von Meyerhof 1918 veröffentlichten Arbeiten über das Vorkommen eines „Atmungskörpers" in der Muskulatur und der Ähnlichkeit desselben mit dem Co-Ferment der Alkoholgärung entstand für von Euler und seine Mitarbeiter das Problem der Bedeutung der Co-Zymase für die Oxydationsprozesse. Sie konnten zeigen, daß die Co-Zymase nicht mit dem von Banting und Best im Jahre 1922 dargestellten Insulin identisch war. Mit Hilfe von Thunbergs Methylenblaumethodik fanden von Euler und Nilsson (1, 2, 3), daß die Trockenhefe durch Auswaschen der Fähigkeit beraubt werden konnte, bei Anwesenheit von gewissen Substanzen Methylenblau zu reduzieren. Sie waren anfangs der Ansicht, daß dies darauf beruhte, daß die Hefe durch das Auswaschen ihr Co-Ferment für die Oxydations-Reduktionsprozesse, das sie Co-Reduktase nannten, verlor. Bald konnten sie jedoch zeigen, daß dieses Co-Ferment mit größter Wahrscheinlichkeit mit der Co-Zymase identisch war.

Das Arbeiten mit der Co-Zymase in ihrer Eigenschaft als Co-Reduktase lieferte anfangs ziemlich widersprechende Resultate. Man schrieb

der Co-Zymase eine allzu generelle Wirkung bei den enzymatischen Dehydrierungsprozessen zu. Allmählich zeigte sich indessen, daß nur der Prozeß, der zur Oxydation der phosphorylierten Hexosen oder eines ihrer Spaltungsprodukte führte, durch die Co-Zymase aktiviert wurde. Auch ausgewaschene Trockenhefe konnte eine Dehydrierung von z. B. Bernsteinsäure und Milchsäure herbeiführen (siehe von Euler, Nilsson und Runeberg).

Im Jahre 1926 zeigten Myrbäck und Jakoby (1), daß Trockenhefe Acetaldehyd nur bei Anwesenheit eines auswaschbaren Co-Fermentes verbrauchte. Sie stellten sich hierbei vor, daß der Acetaldehyd durch Dismutation zu Alkohol und Essigsäure umgesetzt wird und tauften daher das hypothetische Co-Ferment Co-Mutase. Schon im nächsten Jahre glaubten jedoch von Euler und Myrbäck (4) mit Sicherheit feststellen zu können, daß das neue Co-Ferment mit der Co-Zymase identisch sei.

Die Annahme, daß die Co-Zymase als Co-Mutase fungiere, bekam große Bedeutung für die Auffassung ihrer Rolle beim Kohlehydratabbau. Schon in der gleichen Arbeit, in der diese Annahme zuerst veröffentlicht wurde, wurde auch die Theorie aufgestellt, daß die Reaktion, an der die Co-Zymase während des Kohlehydratabbaues mitwirkt, den gleichen Charakter wie eine Aldehyddismutation habe.

Auf Grund einiger experimenteller Resultate, hauptsächlich von Nilsson (1), ist man bei von Euler während der letzten Jahre genötigt gewesen, seine anfängliche Auffassung der Stadien im Kohlehydratabbau, wo die Co-Zymase ihre Wirkung ausübt, zu modifizieren. Nilsson glaubt gezeigt zu haben, daß die Bildung von Hexosemonophosphorsäure ohne Mitwirkung der Co-Zymase erfolgen kann. Seiner Ansicht nach ist die Co-Zymase bei der Spaltung der Hexosemonophosphorsäure erforderlich. Den Verlauf dieser Spaltung stellt er sich folgendermaßen vor:

$$CH(OH):C(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH(OH)\cdot CH_2\cdot O\cdot PO_3H_2 = C_3H_6O_3 + CHO\cdot CH(OH)\cdot CH_2O\cdot PO_3H_2.$$

Die Hexosemonophosphorsäure würde also in ein Molekül Glyzerinaldehydphosphorsäure und ein Molekül Methylglyoxal gespalten werden. Das Methylglyoxal, das man sich in Übereinstimmung mit Neubergs Auffassung als in einer labilen Form auftretend vorstellt, wird weiter vergoren, während zwei Moleküle Glyzerinaldehydphosphorsäure sich zu einem Molekül Hexosediphosphorsäure vereinigen.

Nilsson hat bei gewissen Gärungsversuchen bei Anwesenheit von Acetaldehyd und Fluorid Glyzerinsäurephosphorsäure isolieren können, die er als ein Dismutationsprodukt zwischen dem zugesetzten Acetaldehyd

und der primär gebildeten Glyzerinaldehydphosphorsäure auffaßt. Nilsson hat im übrigen die Annahme aufgegeben, daß das Hefeferment imstande sei, eine einfache Dismutation von Acetaldehyd herbeizuführen. Er ist nunmehr der Ansicht, daß das Verschwinden des Acetaldehyds im Hefesaft darauf beruht, daß er als Wasserstoffakzeptor dient und hierbei in Äthylalkohol umgewandelt wird.

Von Eulers und Nilssons Auffassung betreffs der Bedeutung der Phosphorylierung nähert sich, wie aus der oben angeführten Formel hervorgeht, stark der von Meyerhof. Nur der Mechanismus bei der Spaltung der Hexosemonophosphorsäure selbst ist etwas verschieden [siehe im übrigen Nilsson (2)].

Die vielleicht bedeutungsvollste Arbeit, die in von Eulers Laboratorium ausgeführt worden ist, ist Myrbäcks Isolierung und Identifikation der Co-Zymase. Nach vieljähriger Arbeit ist es Myrbäck und von Euler (1, 2, 3), Myrbäck, von Euler und Hellström (1) und von Euler und Myrbäck (6, 7, 8) gelungen nachzuweisen, daß die Co-Zymase eine Adenyisäure mit spezifischen Eigenschaften ist, am nächsten mit der Muskeladenylsäure verwandt. Im Anschluß an Lohmann haben dann von Euler und Nilsson (4) und von Euler, Nilsson und Auhagen (1) gezeigt, daß diese Adenylsäure in ihrer Wirkung durch Mg-Ionen unterstützt wird.

In letzter Zeit haben von Euler und seine Mitarbeiter einige vergleichende Arbeiten über die Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure und der Co-Zymase als Co-Ferment für die Alkohol- und Milchsäuregärung ausgeführt [siehe Nilsson und von Euler, von Euler und Nilsson (6), von Euler und Myrbäck (9)].

Diese Arbeiten haben zu Resultaten geführt, die teilweise denen von Lohmann widersprechen. Sie zeigen, daß die Adenosintriphosphorsäure die Co-Zymase nur sehr unvollständig bei der Alkoholgärung ersetzen kann, und daß in dieser Hinsicht überdies große Unterschiede zwischen verschiedenen Adenosintriphosphorsäurepräparaten vorhanden sind. Die nach Fiskes Methode dargestellte Adenosintriphosphorsäure scheint im allgemeinen größere Co-Enzymwirkung zu haben als die nach Lohmann dargestellte [Fiske und Subbarow (1) veröffentlichten ungefähr gleichzeitig mit Lohmann eine Methode zur Darstellung von Adenosintriphosphorsäure aus Muskulatur]. Man hat bei von Euler nicht die Auffassung Lohmanns bestätigen können, daß die Co-Zymase bei der Milchsäurebildung eine weniger ausgeprägte Co-Fermentwirkung habe als die Adenosintriphosphorsäure.

Zusammen mit Neuberg hat von Euler einen Vorschlag zur Nomenklatur für die bei der Alkoholgärung mitwirkenden Fermentkomponenten ausgearbeitet (siehe Neuberg und von Euler). Das

thermolabile Fermentsystem der ganzen Alkoholgärung wird in diesem Vorschlag nach Buchner Zymase genannt. Die zu diesem Fermentsystem gehörigen, bisher bekannten und benannten Fermente sind: 1. Phosphatese, die die Phosphorylierung der Hexose bewirkt, 2. Glykolase, die die Spaltung der Hexose verursacht, 3. Carboxylase, die die Decarboxylierung der Brenztraubensäure bewirkt, 4. Ketonaldehydmutase, die Methylglyoxal in Milchsäure überführt, und 5. Phosphatase, die die Dephosphorylierungen bewirkt. Von nicht enzymatischen Aktivatoren sind bis jetzt 3 bekannt, nämlich: 1. die Co-Zymase, 2. der Mg-Ion und 3. die von Auhagen entdeckte Co-Carboxylase. Die Zymase + alle nicht enzymatischen Aktivatoren werden Holozymase genannt. Apozymase ist die von Co-Zymase befreite Holozymase.

Kluyver und Struyk.

Die Holländer Kluyver und Struyk haben sich während vielen Jahren mit Studien des Problems der Phosphorylierung und des Gärungs-Co-Ferments beschäftigt. Ihre Auffassung des Phosphorylierungsverlaufes nähert sich nunmehr sehr der von von Euler und Nilsson akzeptierten. Sie drücken denselben durch folgende Formeln aus:

1. $C_6H_{12}O_6 + PO_4R_2H = C_6H_{11}O_5(PO_4R_2) + H_2O$.
2. $C_6H_{11}O_5(PO_4R_2) = C_3H_6O_3 + C_3H_5O_2(PO_4R_2)$.
3. $C_3H_6O_3 = CO_2 + C_2H_3O$.
4. $C_3H_5O_2(PO_4R_2) + H_2O = C_3H_6O_3 + PO_4R_2H$.

[Siehe Kluyver und Struyk (1, 2).]

Der wesentliche Unterschied zwischen der Auffassung von Kluyver und Struyk und der von von Euler und Nilsson liegt darin, daß die beiden Holländer die Kondensation der Glyzerinaldehydphosphorsäure zu Hexosediphosphorsäure als eine abnorme Reaktion betrachten, die nur beim Arbeiten mit Extrakten vorkommt, in denen auf Grund von Enzymschädigung eine Anhäufung von Glyzerinaldehydphosphorsäure stattfindet.

Es ist Kluyver und Struyk jedoch nicht gelungen, die Glyzerinaldehydphosphorsäure während der Gärung zu isolieren. Ihre Formeln haben deshalb nur theoretisches Interesse.

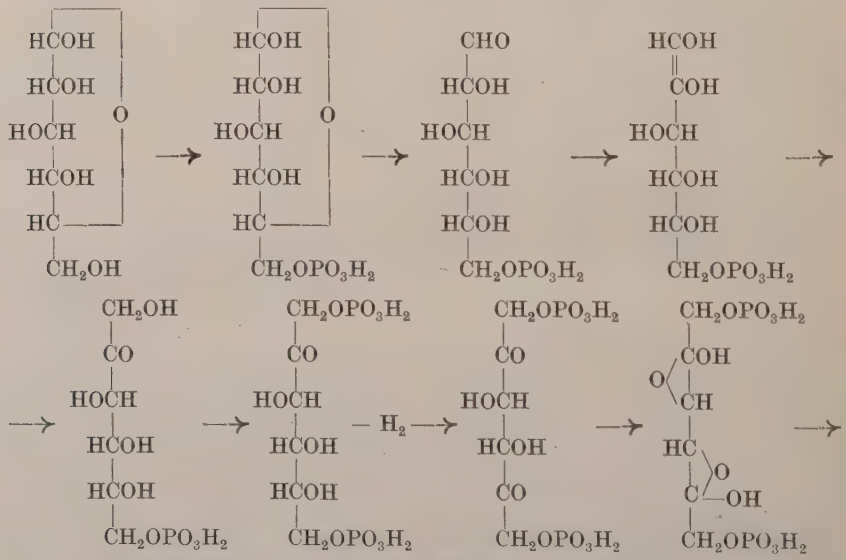
Mit Hinsicht auf das Co-Zymaseproblem nehmen Kluyver und Struyk (3) das Vorkommen einer Serie von Substanzen an, die in verschiedener Weise aktivierend auf den Gärungsverlauf einwirken. Hierbei legen sie besonderes Gewicht auf die Hexosediphosphorsäure und den Acetaldehyd, von welchen beiden angenommen wird, daß sie als Wasserstoffakzeptoren fungieren, die Hexosediphosphorsäure möglicherweise auch als Mithelfer bei der Phosphorylierung. Der „Atmungskörper“

Meyerhofs wird von diesen Verfassern als eine Antiprotease betrachtet, die durch Schützen des Enzyms wirkt.

Da sie der Ansicht sind, daß der Co-Zymasebegriff eine Vermengung dieser verschiedenen Faktoren verursacht hat, verlangen sie, daß dieser Begriff ganz abgeschafft werden soll. Sie stellen sich zu den Resultaten von Eulers und seiner Schüler in der Co-Fermentfrage ganz ablehnend.

Ohle.

Im Jahre 1931 veröffentlichte der deutsche Chemiker Ohle (1) eine Arbeit, „Die Chemie der Monosaccharide und der Glykolyse", in der er eine Theorie für den biologischen Kohlehydratabbau über Moleküle mit dreigliederigen Kohlenstoffketten vorlegte. Diese Theorie, die als das Ergebnis seiner rein chemischen Arbeiten über die Monosaccharide und ihre Ester entstanden ist, hat er in einem Abbauschema von folgendem Aussehen zusammengefaßt:



$$\rightarrow CH_2(OH)\cdot CO\cdot CH_2(OPO_3H_2) + CHO\cdot CO\cdot CH_2(OPO_3H_2)$$

$$CHO\cdot CO\cdot CH_2(OPO_3H_2) + H_2 = CHO\cdot CH(OH)\cdot CH_2(OPO_3H_2)$$

$$CHO\cdot CH(OH)\cdot CH_2(OPO_3H_2) = H_3PO_4 + CH_3\cdot CO\cdot CHO$$

$$CH_2(OH)\cdot CO\cdot CH_2(OPO_3H_2) = H_3PO_4 + CH_3\cdot CO\cdot CHO$$

Ohle ist der Ansicht, daß die Glukose zuerst zu einer Glukose-6-Phosphorsäure verestert wird. Diese kann leicht zu Fruktofuranose-6-Phosphorsäure umgelagert werden, einem Monoester, der seinerseits dann leicht eine Phosphorylierung erfährt, wodurch Fruktose-1-6-Diphosphorsäure gebildet wird. Da dieser Ester, Harden-Youngs Ester,

in seinem reduzierenden System gegen Angriffe geschützt ist, glaubt Ohle, daß er, wenn er durch ein mildes Dehydrierungsmittel der Oxydation ausgesetzt wird, beim 5-Kohlenstoffatom angegriffen wird. Es resultiert eine 5-Keto-Fruktose-1,6-Diphosphorsäure. Dieses Molekül ist äußerst instabil und zerfällt daher leicht in ein Molekül Dioxyacetonphosphorsäure und ein Molekül Oxymethylglyoxalphosphorsäure. Die letztere kann im weiteren als Akzeptor für den Wasserstoff dienen, der freigemacht wird, wenn neue Hexosediphosphorsäuremoleküle dehydriert werden, und hierbei geht sie in Glyzerinaldehydphosphorsäure über. Die Glyzerinaldehydphosphorsäure und die Dioxyacetonphosphorsäure spalten schließlich ihre Phosphorsäureradikale ab und werden in Methylglyoxal umgelagert, worauf die Gärung nach Neubergs Schema weitergeht. Ohle dürfte mit diesem Schema der erste sein, der auf der Voraussetzung, daß die Hexosediphosphorsäure ein obligatorisches Zwischenprodukt ist, ein vollständiges Abbauschema aufgebaut hat.

Thunberg.

Thunberg (2) hat schon 1929 hervorgehoben, daß die Hexosediphosphorsäure bei oxydativer Spaltung der labilste Hexosephosphorsäureester sein dürfte. Er stützte sich hierbei hauptsächlich auf Beobachtungen an Extrakten von Pflanzensamen, bezüglich derer sich in einer Menge von Fällen zeigte, daß sie das Vermögen haben, Methylenblau bei Gegenwart von Hexosediphosphorsäure zu reduzieren, während sämtliche geprüften Monoester ein negatives Resultat ergaben. Deuticke (1) und Thunberg (4) haben gezeigt, daß Adenosintriphosphorsäure, dargestellt nach Fiske, die Methylenblauentfärbung in Muskelextrakt und in Extrakt aus Pflanzensamen zu aktivieren vermag. Sie haben jedoch nicht näher die Prozesse untersucht, die diesem Phänomen zugrunde liegen.

Hahn.

Der Auffassung Thunbergs, daß die Hexosediphosphorsäure leicht eine oxydative Spaltung erfährt, haben sich später Hahn und Haarmann (3) angeschlossen. Sie haben gezeigt, daß die Hexosediphosphorsäure von Muskelbrei bei Gegenwart von Methylenblau zu Brenztraubensäure gespalten wird. Sie sagen: „In völliger Übereinstimmung mit Thunberg kommen auch wir zum Schluß, daß hinsichtlich der Oxydierbarkeit Fruktosediphosphorsäure nicht, wie Meyerhof und Lohmann annehmen, ein Stabilisierungsprodukt der Hexosen, sondern eine besonders labile und leicht abbaubare Verbindung darstellt."

Hahn und Fischbach (1), die sich auch mit der Oxydation der Milchsäure beschäftigt haben, bezweifeln das Vorkommen eines Co-

Ferments für diesen Prozeß. Sie schließen sich hierbei Ahlgren (1) an, der auch keine Stütze für die Annahme hat finden können, daß für die Milchsäureoxydation ein Co-Ferment vorhanden sei.

Szent-Györgyi.

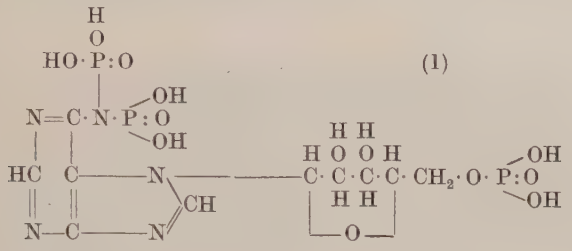
Szent-Györgyi (1, 2), der hauptsächlich mit Oxydationsprozessen der Zelle gearbeitet hat, ist zu der Auffassung gelangt, daß die Milchsäureoxydation ein besonderes Co-Ferment erfordert. Anfangs schien er am ehesten geneigt zu sein, diesem Co-Ferment den Charakter eines Wasserstofftransporteurs zuzuschreiben, aber später hat er gezeigt, daß es einen Stoff enthält, der wahrscheinlich eine Adenylsäure ist, und nicht mit Lohmanns Adenosintriphosphorsäure identisch sein kann [siehe Banga und Szent-Györgyi (1, 2) und Banga, Szent-Györgyi und Vargha]. Eine Zeitlang war Szent-Györgyi der Ansicht, daß die Milchsäure unter dem Einfluß dieses Co-Ferments direkt und vollständig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert werde. Später hat er diese Auffassung fallen lassen und er glaubt nun, daß die Reaktion, an der das Co-Ferment teilnimmt, eine einfache, reversible Dehydrierung ist, bei der Brenztraubensäure gebildet wird.

Laut Szent-Györgyi besteht eine weitgehende Spezialisierung unter den verschiedenen, als Co-Ferment wirksamen Adenylsäuren.

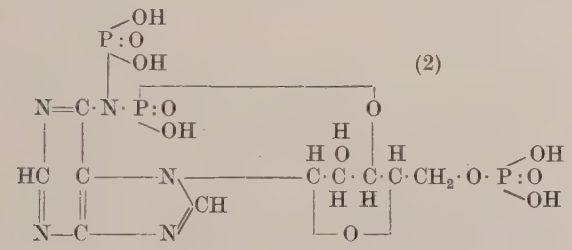
Barrenscheen.

Barrenscheen, der sich früher viel mit Untersuchungen über die Phosphorylierung in Pflanzenmaterial beschäftigt hat, hat während der letzten Jahre die Co-Fermentfrage zur Behandlung aufgegriffen. Er geht hierbei von Lohmanns Angaben über den chemischen Charakter seines Co-Fermentes aus und schließt sich in bezug auf seine Funktion der Auffassung an, die Neuberg für das Co-Ferment der Alkoholgärung ausgesprochen hat, daß sie nämlich insofern eine doppelte sei, als das Co-Ferment teils für die Phosphorylierung, teils für die Spaltung des phosphorylierten Zuckers von Bedeutung ist. Mit einer Modifikation von Fiskes Methode haben Barrenscheen und Filz (1, 2, 3) eine Adenosintriphosphorsäure dargestellt, die ebenso wie Fiskes ein 3-Ag-Salz ergibt. Durch Behandlung dieser Säure mit Nitrit-Eisessig glaubt Barrenscheen sie in eine Säure mit einem 4-Ag-Salz überführen zu können, die eine bedeutend größere Co-Fermentaktivität als die ursprüngliche Säure besitzt (siehe Barrenscheen und Müller). Barrenscheen und Filz (2) und Barrenscheen, Braun und Filz (1) sind auch, auf Grund gewisser Untersuchungen über Dephosphorylierung und Ammoniakabspaltung, zu der Auffassung gelangt, daß zwei der Phosphorsäurereste der Adenosintriphosphorsäure an die primäre Aminogruppe gebunden

sind, eine Auffassung, die von Lohmann (9) bestritten wird. Barrenscheen und Filz geben folgende Formeln für die von ihnen dargestellten Adenosintriphosphorsäuren an:



(1)



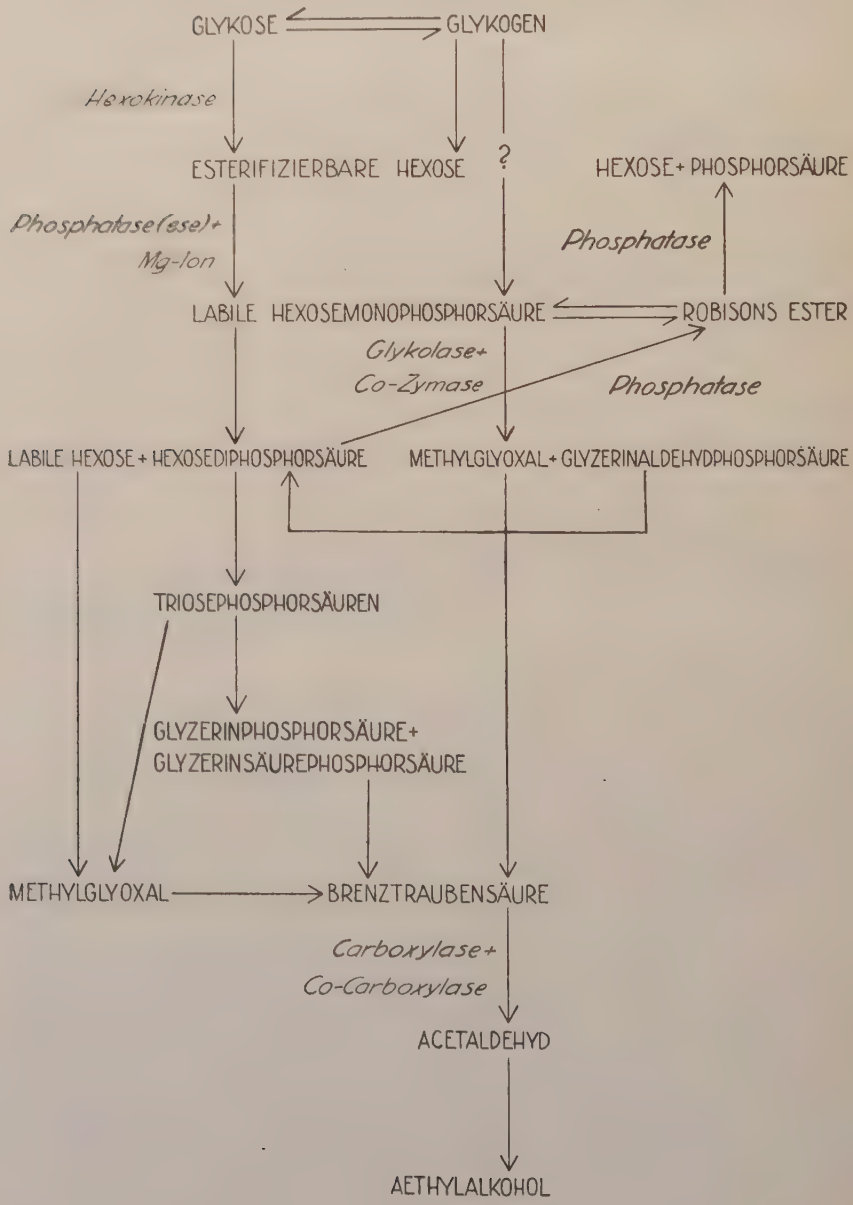
(2)

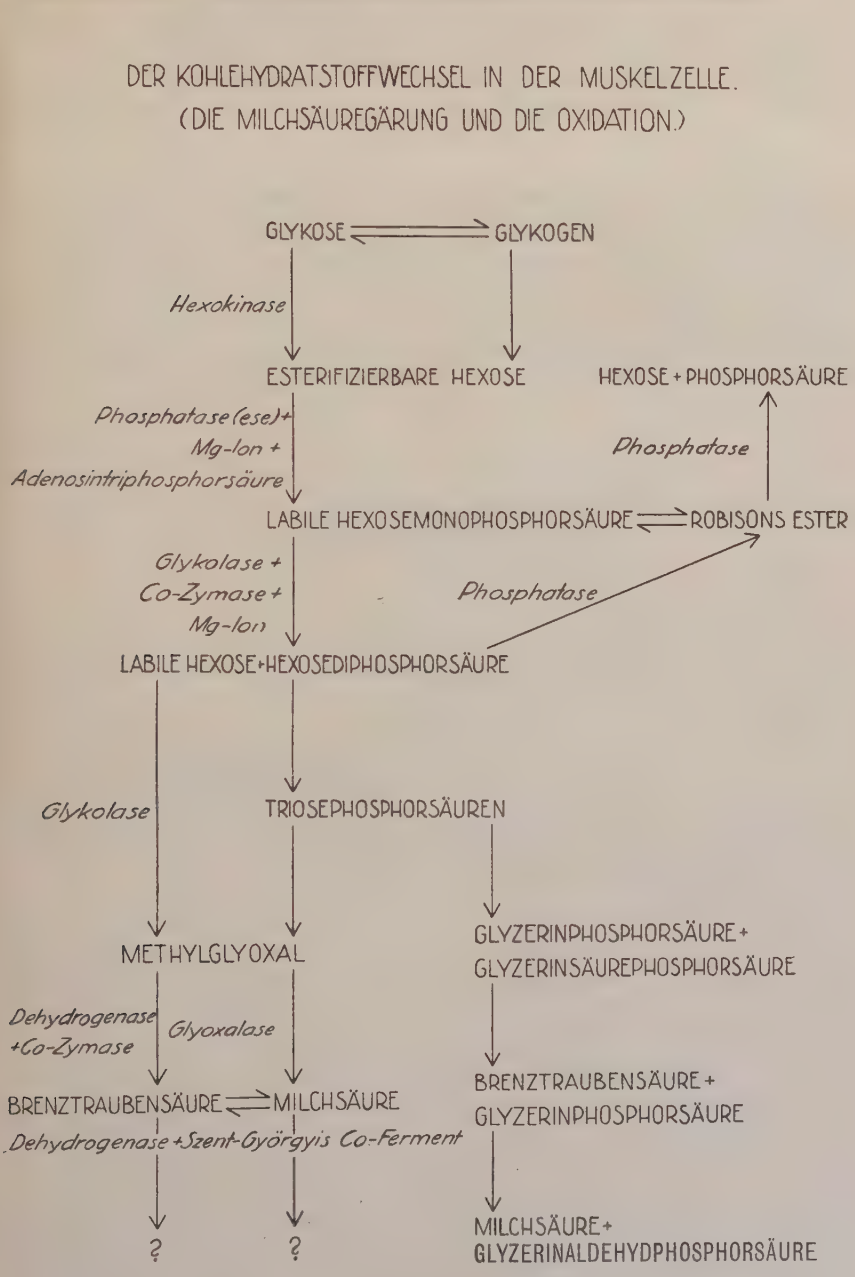
Warburg.

Warburg hat bei seiner Arbeit über den Oxydationsmechanismus der Zelle sich sehr wenig mit den Veränderungen beschäftigt, die das Substrat, d. h. in diesem Falle die Hexose oder ihre Umwandlungsprodukte, betreffen. Die Ursache hierfür ist, daß Warburg ursprünglich der Ansicht war, die Fermentwirkung habe bei den biologischen Oxydationen ganz den Charakter einer „Sauerstoffaktivierung". Diese Sauerstoffaktivierung wurde von Warburgs „Atmungsferment" vermittelt, welches dadurch ausgezeichnet wurde, daß es 3-wertiges Hämineisen enthielt (später auch in Katalase und Peroxydase entdeckt).

Beim Studieren der Glykoseoxydation durch rote Blutkörperchen fanden indessen Warburg und Christian (1), daß auch Faktoren, die auf das Substrat einwirken, notwendig sind. So zeigte es sich zuerst, daß die Hexose phosphoryliert werden mußte. Dann mußte sie aber auch durch ein Fermentsystem angegriffen werden, das aus einem Ferment und einem Co-Ferment bestand. Wenn diese zugesetzt wurden, konnte indessen Hexosemonophosphorsäure von dem Sauerstoff der Luft auch in Abwesenheit von Substanzen, die 3-wertiges Hämineisen enthielten, oxydiert werden. Diese Eigentümlichkeit hat Warburg dadurch zu erklären versucht, daß er angenommen hat, das Substrat werde „überaktiviert", wenn es von gelösten Fermenten angegriffen

DER KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL IN DER HEFE. (DIE ALKOHOLGÄRUNG)




DER KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL IN DER MUSKELZELLE.
(DIE MILCHSÄUREGÄRUNG UND DIE OXIDATION.)
GLYKOSE
GLYKOGEN
Hexokinase
ESTERIFIZIERBARE HEXOSE
HEXOSE + PHOSPHORSÄURE
Phosphatase(ese)+
Mg-Ion +
Adenosintriphosphorsäure
Phosphatase
LABILE HEXOSEMONOPHOSPHORSÄURE
ROBISONS ESTER
Glykolase +
Co-Zymase +
Mg-Ion
Phosphatase
LABILE HEXOSE+HEXOSEDIPHOSPHORSÄURE
Glykolase
TRIOSEPHOSPHORSÄUREN
METHYLGLYOXAL
GLYZERINPHOSPHORSÄURE +
GLYZERINSÄUREPHOSPHORSÄURE
Dehydrogenase
+Co-Zymase
Glyoxalase
BRENZTRAUBENSÄURE
MILCHSÄURE
BRENZTRAUBENSÄURE +
GLYZERINPHOSPHORSÄURE
Dehydrogenase +Szent-Györgyis Co-Ferment
?
?
MILCHSÄURE +
GLYZERINALDEHYDPHOSPHORSÄURE

wird. In dieser Weise sollte die normalerweise notwendige Sauerstoffaktivierung entbehrlich werden.

Batelli und Stern.

Batelli und Stern zeigten schon 1908, daß ein Wasserextrakt aus Muskulatur die Oxydationsintensität von Muskulatur erhöhte. Sie erklärten dies durch die Annahme, daß im Extrakt ein Oxydations-Co-Ferment vorkomme, dem sie den Namen Pnein gaben. Dies war also ein Vorläufer zu Meyerhofs und Szent-Györgyis Atmungs-Co-Fermenten, aber Batelli und Stern haben wahrscheinlich mit einem verwickelten System von Substanzen gearbeitet, von denen einige selbst als Brennstoffe fungierten (siehe Stern).

II. Bisherige Untersuchungen über die Beeinflussung des Zuckerabbaues durch Arsenat und Arsenit, Fluorid und Monobromacetat.

Die Arsenat- und Arsenitwirkung.

Harden und Young (3) zeigten 1906 zum ersten Mal, daß Arsenat eine stark aktivierende Wirkung auf die Vergärung von Zucker mit Buchnersaft hatte. Die Ähnlichkeit zwischen Phosphor und Arsen machte die Annahme natürlich, daß das Arsenat hierbei nur vikariierend für Phosphat eintrat. Die weiteren Versuche der obengenannten Autoren zeigten indessen, daß es sich nicht so verhielt. Das Arsenat wurde nicht zur Bildung irgendeiner organischen Arsenverbindung verbraucht, und die Erhöhung des Gesamtumsatzes, die mit einer gegebenen Menge Arsenat erzielt werden konnte, übertraf daher bei weitem die mit einer entsprechenden Menge Phosphat zu erreichende. Ferner zeigte es sich, daß der stimulierende Einfluß des Arsenates ein ausgeprägtes Optimum hatte, indem größere Arsenatkonzentrationen eine deutliche Hemmung verursachten. Die Optimalkonzentration variierte ziemlich beträchtlich mit verschiedenen Hefesäften. Sie lag höher für Fruktose als für Glykose. Die von Harden und Young für diesen Effekt zuerst gemachten Deutungsversuche sowie die weitere Entwicklung der Theorien über die Arsenatwirkung bei der Alkohol- und Milchsäuregärung durch Meyerhof und Neuberg sind im vorhergehenden Kapitel beschrieben worden.

Der Einfluß des Arsenits auf den Gärungsverlauf war noch früher bekannt als der des Arsenats. Buchner und Rapp (1) hatten bei Versuchen zur Verwendung des Arsenits als Antiseptikum für Hefepreßsaft beobachtet, daß es in kleinen Konzentrationen die Gärung zu beschleunigen vermochte, während größere Konzentrationen hemmend wirkten. Harden

und Young (5) haben diese Beobachtungen später parallel mit ihren Arsenatversuchen erweitert und sind zu dem Schlußsatz gekommen, daß die Arsenitwirkung der Arsenatwirkung vollkommen analog ist, jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie diese.

In letzterer Zeit haben sich Szent-Györgyi und seine Mitarbeiter mit dem Einfluß des Arsenits auf Oxydationsprozesse der Zelle beschäftigt [siehe Szent-Györgyi (3), Banga und Szent-Györgyi (1), Banga, Schneider und Szent-Györgyi (1)]. Sie haben hierbei u. a. gefunden, daß die Oxydationsprozesse in der Muskulatur in solche eingeteilt werden können, die durch Arsenit gehemmt werden, und in solche, die für den Einfluß von Arsenit unempfindlich sind. Szent-Györgi glaubt, daß die Milchsäureoxydation zu den arsenitempfindlichen Oxydationen gehört. In den arsenitunempfindlichen Oxydationsprozessen scheint es ihm, als ob Adenylsäure-Adenylpyrophosphat und Hexosediphosphat eine gewisse Rolle spielen.

Die Fluoridwirkung.

Natriumfluorid hat einen stark hemmenden Einfluß auf den Gärungsverlauf. Lipmann (1, 2), der sich viel mit dem Problem der Fluoridvergiftung beschäftigt hat, hat gezeigt, daß das Fluorid auf jene Phosphatasen, die u. a. Hexosediphosphorsäure spalten, stark hemmend wirkt.

Macfarlane (1) hat gefunden, daß die Vergärung von Hexosediphosphorsäure von Fluorid in Konzentrationen, die zur Hemmung der Phosphatasen nicht genügen, gehemmt wird. Diese Hemmung findet trotz Arsenzusatz statt.

Nilsson (1) hat die Vergärung von Glykogen bei Anwesenheit von Fluorid studiert und hierbei festgestellt, daß die Gärung in höherem Grade gehemmt wird als die Phosphorylierung. Die überschüssige Phosphorylierung führt zur Bildung von so gut wie reinem Robison-Ester. Nilsson hat auch die Fluoridvergiftung der Gärung bei Zusatz von Hexosediphosphorsäure und von Acetaldehyd studiert, welch letzterer als Wasserstoffakzeptor wirkt. Er verwendete hierzu ein Trockenhefepräparat. Diese Versuche führten zur Isolierung eines Esters, der sich als eine Glyzerinsäurephosphorsäure herausstellte. Sie sind dadurch von großem Interesse, daß sie die Grundlage für von Eulers und Nilssons letzte Gärungstheorie gebildet haben.

Schließlich haben Embden und seine Mitarbeiter gezeigt, daß Muskelpreßsaft nach Fluoridvergiftung Hexosediphosphorsäure spaltet, so daß Glyzerinsäurephosphorsäure gebildet wird (siehe Embden, Deuticke und Kraft). Sie haben auf Grund ihrer Versuche eine Theorie über die Milchsäuregärung aufgebaut, die das Methylglyoxalstadium

umgeht, das bekanntlich der schwache Punkt in Neubergs Abbauschema ist.

Da die Glyzerinsäurephosphorsäure durch Säurehydrolyse nur mit größter Schwierigkeit zu spalten ist, sind Embden und seine Mitarbeiter der Ansicht, daß Lohmanns (2) und Lipmanns und Lohmanns (1) frühere Resultate ihrer Versuche, bei denen sie in fluoridvergifteten und in verdünnten Muskelextrakten die Bildung einer schwerhydrolysierbaren Hexosediphosphorsäure zu beobachten glaubten, nicht genügend begründet sind. Dies wird neuerdings auch von Meyerhof (5) zugegeben. Der gebildete Ester ist wahrscheinlich auch hier eine Glyzerinsäurephosphorsäure gewesen.

Die Monojod- und die Monobromessigsäurevergiftung.

Nachdem Lundsgaard (1) 1930 die Aufmerksamkeit auf die Fähigkeit der monohalogensubstituierten Essigsäuren, den Kohlehydratstoffwechsel zu stören, gelenkt hat, sind mit Hilfe dieser Substanzen eine Reihe von Arbeiten ausgeführt worden, die Licht in einige vorher dunkle Fragen gebracht haben. Lundsgaard (1 bis 5) zeigte, daß die Monojodessigsäure die Milchsäurebildung in der Muskulatur und die Alkoholgärung in der Hefe hemmt. Er zeigte auch, daß es möglich war, mit Hilfe einer geeigneten Giftkonzentration die Gärung zu hemmen, während die Oxydationsprozesse mehr oder weniger ungestört fortsetzten. Gleichzeitig mit dem Aufhören der Milchsäurebildung kam es in der Muskulatur zu einer Anhäufung von Hexosemono- und Hexosediphosphorsäure.

Lundsgaard zeigte überdies, daß der monojodessigsäurevergiftete Muskel fortwährend imstande war, Arbeit zu verrichten, trotzdem die Milchsäurebildung gänzlich aufgehört hatte. Hierdurch wurde die alte Streitfrage, ob die Milchsäurebildung direkt Energie zur Kontraktion liefert, endgültig entschieden. Lundsgaard fand, daß Energie für die Kontraktionsarbeit im monojodessigsäurevergifteten Muskel durch Spaltung von Kreatinphosphorsäure, dem Phosphagen, erhalten wird, also ein Prozeß, der dem Auslösungsmechanismus selbst näher zu liegen scheint als die Milchsäurebildung.

1931 zeigten Meyerhof und Boyland, daß der monojodessigsäurevergiftete Muskel noch das Vermögen hat, zugesetzte Milchsäure zu oxydieren, daß aber die Sauerstoffkonsumtion hierbei gut der Menge verschwundener Milchsäure entspricht, so daß es ausgeschlossen erscheint, daß unter solchen Umständen eine Glykogensynthese stattfinden könnte. Eine Kohlehydratoxydation konnten Meyerhof und Boyland in der monojodessigsäurevergifteten Muskulatur nicht nachweisen. Meyerhofs und Boylands Untersuchungen wurde von Banga, Schneider und Szent-Györgyi (2) widersprochen, die in einer Arbeit nach-

gewiesen zu haben glaubten, daß ein Laktatzusatz die Atmung von monojodessigsäurevergifteter Herzmuskulatur nicht beeinflußt. Szent-Györgyis Resultate haben jedoch keine Bestätigung erhalten, und es besteht Grund zu der Annahme, daß die von ihm verwendete Muskulatur so große Milchsäuremengen enthalten hat, daß durch Zusatz von neuen Mengen Laktat keine Zunahme der Oxydation hat erzielt werden können.

Etwas früher als Meyerhof und Boyland hat Krebs (1) gezeigt, daß die Milchsäureoxydation gegenüber Monojodessigsäurevergiftung in Hirn, Testis und Tumorgewebe unempfindlich ist.

Meyerhof, Gemmill und Benetato (1) haben gefunden, daß die starke Phosphagenspaltung, die bei der Kontraktion eines monojodessigsäurevergifteten Muskels zustande kommt, durch Laktatzusatz gehemmt werden kann.

Mawson (1, 2) ist zu ähnlichen Resultaten wie Meyerhof und seine Mitarbeiter gekommen. Mawson ist der Ansicht, daß ein Laktatzusatz auch eine Vermehrung der Menge Adenosintriphosphorsäure und eine Abnahme der Menge angehäufter Hexosephosphorsäureester hervorruft. Er konstatiert ferner, daß das Phosphagen zuweilen nur bis etwa 60 Proz. abgebaut wird, bevor der Muskel mit den Kontraktionen aufhört.

In bezug auf die Frage, welche Fermente oder Fermentsysteme bei der Monojodessigsäurevergiftung betroffen werden, sind die Ansichten sehr geteilt gewesen. Lohmann (4) hat gezeigt, daß die Milchsäurebildung aus Glykogen in Muskelextrakt durch Monojodessigsäure stärker gehemmt wird als die Milchsäurebildung aus Hexosediphosphorsäure. Er hat auch beobachtet, daß nach genügend starker Vergiftung die Abspaltung von anorganischem Phosphat durch die Hexosediphosphorsäure gehemmt ist. Lohmann nimmt an, daß die Reaktion, die zur Bildung oder möglicherweise zur Spaltung von Meyerhofs hypothetischer labiler Hexosemonophosphorsäure führt, für die Monojodessigsäurevergiftung besonders empfindlich ist.

Yamasaki (1) hat beim Arbeiten in Neubergs Laboratorium konstatieren zu können geglaubt, daß die Monojodessigsäurevergiftung in Mazerationssaft aus Hefe die Vergärung von nicht phosphoryliertem Zucker aufhebt, während die Vergärung von Hexosediphosphorsäure unbeeinflußt verbleibt.

Thunberg hat dagegen (bei nicht veröffentlichten Versuchen) mit Pflanzensamen die Beobachtung gemacht, daß die Methylenblauentfärbung bei Gegenwart von Hexosediphosphorsäure durch das wie Monojodazetat wirkende Monobromazetat gehemmt wird, während die Methylenblauentfärbung nach Zusatz von Glykogen fast unbeeinflußt verbleibt.

Wie diese sich anscheinend widersprechenden Resultate zu erklären sind, ist jetzt unmöglich zu sagen. Es gibt jedoch zwei Beobachtungen,

die hierbei große Bedeutung bekommen dürften. Die eine stammt von Lohmann (4), der gezeigt hat, daß die Monojodessigsäurevergiftung eine relativ langsame Reaktion ist, die unter Umständen Stunden benötigt, um sich vollkommen zu entwickeln. Die zweite Beobachtung, die von Quastel und Wheatley (1) gemacht worden ist, bezieht sich auf das Vermögen der Monojodessigsäure, mit gewissen Zellenbestandteilen zu reagieren. Diese Forscher haben nämlich gefunden, daß die Monojodessigsäure nicht nur mit gewissen Fermenten reagiert, sondern auch mit Stoffen, die Sulfhydrylgruppen enthalten (Cystein, Glutathion) [siehe auch Thunberg (1)].

Barrenscheen, Braun und Dreguss (1) haben vermutet, daß die Wirkung der Monojodessigsäurevergiftung in einer Zerstörung des Co-Fermentes der Milchsäurebildung zu suchen sei.

Dudley (1) ist der Ansicht, daß die Wirkung wahrscheinlich auf einer Hemmung der Glyoxalase beruht.[1] Gegen Dudleys Annahme führt jedoch Lohmann (4) an, daß die Giftkonzentrationen, die erforderlich sind, um die Milchsäurebildung aus Methylglyoxal zu hemmen, diejenigen um ein Vielfaches übersteigen, die zur Hemmung der Milchsäurebildung aus Glykogen oder Hexosediphosphorsäure erforderlich sind. Ganz neuerdings hat Lipmann (3) vorgeschlagen, daß die Monojodessigsäurevergiftung auf einer Oxydation des hexosespaltenden Enzyms beruhen kann, wodurch dieses inaktiviert werden würde.

Lundsgaard (5) und Haarmann haben u. a. gezeigt, daß die Monobromessigsäure eine der Monojodessigsäure analoge Wirkung hat.

III. Über die Spaltung von Hexosediphosphorsäure durch Muskelextrakt bei Anwesenheit eines Wasserstoffakzeptors.

Von Euler und seine Mitarbeiter haben gezeigt, daß das System Apo-Zymase + Co-Zymase + Hexosediphosphorsäure die Fähigkeit besitzt, im Vakuum Methylenblau (Mb) unter Bildung von Leukomethylenblau (Lmb) zu reduzieren. Diese Reaktion ist als ein von der Co-Zymase aktivierter Dehydrierungsprozeß gedeutet worden, zu dem die Hexosediphosphorsäure das Material liefert. Ähnliche Reaktionen können mit Enzymmaterial von sehr verschiedenem Ursprung erhalten werden.

So haben von Euler und Nilsson (1) gezeigt, daß Extrakt von getrockneter Rattenmuskulatur nach Zusatz von Co-Zymase eine ausgeprägte Fähigkeit bekommt, Mb bei Gegenwart von Hexosediphosphorsäure zu reduzieren. Thunberg (2) hat nachgewiesen, daß in Extrakten

[1] Eine solche Hemmung kommt laut Dickens (*Biochem. Journ.* 1933. Vol. XXVII. S. 1141) durch die Reaktion zwischen Glutathion und Monojodessigsäure zustande.

von mehreren Pflanzensamen ein Enzym vorkommt, das bei Gegenwart von Hexosediphosphorsäure eine Mb-Reduktion hervorzurufen imstande ist, und von Euler und Nilsson (5) sowie Andersson (1) haben zeigen können, daß diese Reaktion nur stattfindet, wenn Co-Zymase oder eine andere Substanz mit ähnlicher Wirkung anwesend ist.

Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß die unter diesen Umständen beobachtete Mb-Entfärbung ein empfindlicher Indikator für eine für verschiedene Formen von enzymatischen Kohlehydratabbau gemeinsame Reaktion darstellt, bei der die Co-Zymase mitwirkt.

Von Euler und seine Mitarbeiter sind, wie hervorgehoben wurde, der Ansicht, daß die Funktion der Co-Zymase an eine Reaktion geknüpft ist, bei der eine Hexosemonophosphorsäure gespalten wird. Die Mitwirkung der Co-Zymase bei der oben beschriebenen Spaltung der Hexosediphosphorsäure haben sie folgendermaßen zu erklären versucht: Die Hexosediphosphorsäure wird dephosphoryliert. Hierbei wird ein besonders labiler Zucker gebildet, der schnell wieder zu einer Hexosemonophosphorsäure phosphoryliert wird. Diese Hexosemonophosphorsäure wird dann unter Mitwirkung der Co-Zymase gespalten, wobei dehydrierbare Produkte gebildet werden [siehe z. B. von Euler und Myrbäck (5)].

Falls diese Erklärung richtig ist, würde also die Mb-Entfärbung ein Zeichen dafür sein, daß eine Hexosemonophosphorsäure in Übereinstimmung mit von Euler-Nilssons Theorie gespalten wird.

Nun zeigen Thunbergs Versuche mit Pflanzensamen, daß die Hexosediphosphorsäure wenigstens unter gewissen Verhältnissen labiler ist als die bekannten Hexosemonophosphorsäuren und Hahn und Haarmann (3) sind auch zu dem Schlußsatz gekommen, daß die Hexosediphosphorsäure unter dem Einfluß von Muskelbrei bei Gegenwart von Mb leicht zu Brenztraubensäure gespalten wird.

Übrigens geht aus der Darstellung im Kapitel I klar hervor, daß sich die Forscher, die sich während der letzten Jahre mit hierhergehörigen Dingen beschäftigt haben, in zwei Parteien geteilt haben, von denen die eine, die Hexosediphosphorsäure als ein mehr oder weniger unphysiologisches Stabilisierungsprodukt betrachtet, während die andere Partei die Hexosediphosphorsäure als ein labiles Zwischenprodukt auffaßt.

Es hat den Anschein, als ob ein eingehenderes Durcharbeiten der Reaktion, die zur Entfärbung von Mb im Zusammenhang mit der Spaltung der Hexosediphosphorsäure führt, vielleicht ein gewisses Licht in diese Fragen bringen und neue Gesichtspunkte für das Problem des Mechanismus bei der Spaltung der Hexose zu Molekülen mit dreigliedrigen Kohlenstoffketten eröffnen könnte. Man hat hierbei den Vorteil, Thunbergs Mb-Methodik verwenden zu können, die leicht anzuwenden und außerdem so empfindlich ist, daß sie eine weitgehende Reinigung des Enzymmaterials

gestattet, ohne daß der hierbei unvermeidliche Aktivitätsverlust störend zu wirken braucht.

In diesem Kapitel soll im weiteren über einige Ergebnisse berichtet werden, die bei Versuchen erhalten worden sind, um auf folgende Fragen Antwort zu bekommen:

1. Welche Substanzen können bei der Hexosespaltung als Co-Ferment dienen und welches ist ihre Funktion?
2. Erfährt die Hexosediphosphorsäure eine direkte Spaltung oder besteht Grund zu der Annahme, daß die Spaltung über einen Monoester erfolgt?
3. Welche Wirkung haben Substanzen wie Arsenat, Arsenit, Phosphat, Fluorid und Monobromacetat bei der Spaltung der Hexose?

Die Versuche, die der Darstellung in diesem Kapitel zugrunde liegen, sind so gut wie sämtlich mit Enzymmaterial ausgeführt worden, das durch Extraktion von stark ausgewaschener Muskulatur erhalten worden ist. Die Enzymwirkung ist teils mit Hilfe von Thunbergs Mb-Methodik, teils durch quantitative Untersuchungen über Verschiebungen in den verschiedenen Phosphatfraktionen festgestellt worden.

Welche Substanzen können bei der Hexosespaltung als Co-Ferment fungieren?

Zu Beginn dieser Versuche verfügte ich über ein von Deuticke nach Fiskes Anweisungen dargestelltes Adenosintriphosphorsäurepräparat.

Das Hauptprinzip in Fiskes Methode zur Isolierung von Adenosintriphosphorsäure aus Muskulatur besteht darin, die Säure als Ca-Salz auszufällen, wobei zu beachten ist, daß die Extraktion aus der Muskulatur und die zunächst folgenden Manipulationen bei niedriger Temperatur ausgeführt werden. Die Einzelheiten der Methode sind von Fiske nicht veröffentlicht worden. Deuticke hat früher gezeigt, daß bei Zusatz dieses Präparates zu Extrakt aus mäßig ausgewaschener Muskulatur ein System erhalten wird, welches die Fähigkeit besitzt, Mb im Vakuum zu entfärben.

Es hat sich nun durch meine Versuche herausgestellt, daß, wenn man feingemahlene Muskulatur stark mit Wasser oder Kochsalzlösung auswäscht und den Rückstand darauf mit Phosphatlösung extrahiert, ein Extrakt resultiert, der bei gleichzeitigem Zusatz von Hexosediphosphorsäure und einer Lösung dieses Adenosintriphosphorsäurepräparates eine schnelle Mb-Entfärbung zeigt. Zusatz von nur Hexosediphosphorsäure oder nur Adenosintriphosphorsäure hat dagegen mit einem solchen Extrakt nur wenig Effekt [siehe Holmberg (1)]. [Deuticke hatte in Extrakten aus ausgewaschener Muskulatur eine Methylenblauentfärbung

durch Zusatz von nur Adenosintriphosphorsäure erzielen können. Seine Muskulatur war aber nicht genügend ausgewaschen, so daß seine Extrakte Donatorsubstanzen (Milchsäure, Glykogen?) enthielten.]

Mein Resultat stimmt also gut mit Lohmanns Beobachtungen überein, daß die Adenosintriphosphorsäure als Co-Ferment bei der Milchsäurebildung aus u. a. Hexosediphosphorsäure in Muskelextrakt dienen kann. Dies gilt für Muskelextrakt. Daß die Adenosintriphosphorsäure nicht immer als Co-Ferment dient, sondern zuweilen selbst dehydriert wird, zeigen aber von mir später an Leberextrakt ausgeführte Versuche. Es zeigte sich nämlich, daß Leberextrakte von Meerschweinchen, deren Leber reich an Xanthindehydrogenase ist, nach Zusatz von Mb-Muskeladenylsäure, Hefeadenylsäure, Co-Zymase und Adenosintriphosphorsäure zu dehydrieren vermögen. Eine Oxydation des Purinkerns der Adenylsäuren dürfte also hier stattfinden. Leberextrakt von Tauben, deren Leber arm an Xanthindehydrogenase ist, hat diese Fähigkeit dagegen nicht [siehe Holmberg (5)].

Meyerhof hat bekanntlich früher gezeigt, daß Co-Zymasepräparate aus Hefe als Co-Ferment bei der Milchsäuregärung dienen können. Dies ist von Lohmann (7) bestätigt worden, jedoch mit der Einschränkung, daß eine langwierige Dialyse dem Muskelextrakt die Fähigkeit nimmt, die Co-Zymase als Co-Ferment zu benutzen, während die Co-Fermentwirkung der Adenosintriphosphorsäure bestehen bleibt. Von Euler und Nilsson (6) haben diese Resultate von Lohmann nicht verifizieren können. Sie finden, daß die Co-Zymase als Aktivator der Milchsäurebildung in Muskelextrakt der Adenosintriphosphorsäure immer gleichwertig oder dieser überlegen ist.

In den bei den hier beschriebenen Versuchen verwendeten Extrakten vermag die Co-Zymase auch nach sehr starker Auswaschung der Muskulatur, zehnmal und mehr mit der dreifachen Menge Aqua dest., ebenso wie die laut Fiske dargestellten Adenosintriphosphorsäure, das System Hexosediphosphorsäure-Muskelextrakt so zu komplettieren, daß eine Reduktion von Mb hervorgerufen wird.

Es ist unmöglich, exakte Proportionen zwischen der Aktivatorwirkung der Co-Zymase und der Adenosintriphosphorsäure anzugeben, u. a. aus dem Grunde, da die gereinigte Co-Zymase ziemlich unbeständig und ihr absoluter Gehalt an aktiver Substanz im Versuchsaugenblick daher unbekannt ist. Quantitative, vergleichende Versuche sind deshalb zwecklos. Man erhält jedoch am ehesten den Eindruck, daß die Co-Zymase bei diesen Versuchen der Adenosintriphosphorsäure als Aktivator ziemlich gleichwertig gewesen ist (Versuch 1a und 3).

Einige von mir früher mit Pflanzensamenextrakt ausgeführte vergleichende Versuche zwischen Co-Zymase und Adenosintriphosphorsäure

weisen in dieselbe Richtung. Auch hier dürfte nach den Versuchen von von Euler und Nilsson (5) und auch Andersson (1) die Aktivierung der Mb-Entfärbung auf einer Co-Fermentwirkung beruhen [siehe Holmberg (3)].

Das von mir anfangs verwendete Adenosintriphosphorsäurepräparat war, wie bereits erwähnt, nach der Methode von Fiske dargestellt worden. Später bekam ich Gelegenheit, bei Doktor Jacobsen in Kopenhagen, der selbst in Heidelberg die Lohmannsche Methode studiert hatte, Adenosintriphosphorsäure nach dieser Methode darzustellen. Das hierbei erhaltene Präparat enthielt leicht hydrolysierbares Phosphat und Totalphosphat in den theoretisch richtigen Proportionen und ergab eine starke Pentosereaktion (siehe Kap. 5). Es bestand demnach kein Grund, seine Natur zu bezweifeln. Es zeigte sich indessen, daß dieses Präparat das nach Fiske dargestellte als Co-Ferment bei der von mir studierten Hexosediphosphorsäurespaltung nicht zu ersetzen vermochte (Versuche 1a und 3).

Nilsson und von Euler (1) haben früher das Vermögen der Co-Zymase und der Adenosintriphosphorsäure, als Co-Ferment für die Alkoholgärung dienen zu können, verglichen. Hierbei haben sie konstatiert, daß ein von Lohmann dargestelltes, genau gereinigtes Adenosintriphosphorsäurepräparat nicht imstande war, irgendeine Gärung (Kohlensäureentwicklung) zusammen mit Apozymase hervorzurufen, die sich durch Kontrollprobe als stark aktiv erwiesen hatte. Das nach Fiske dargestellte Adenosintriphosphorsäurepräparat zeigte dagegen eine deutliche Co-Zymasewirkung. Diese variierte jedoch in verschiedenen Präparaten bedeutend und war niemals so stark wie die mit gereinigter Co-Zymase erhaltene. Bei Mb-Versuchen mit Apozymase und Hexosediphosphorsäure erhielten Nilsson und von Euler übereinstimmende Resultate. Von Euler hat aus diesen Versuchen geschlossen, daß die Co-Zymasewirkung, die mit einigen Adenosintriphosphorsäurepräparaten erhalten wird, auf einer Verunreinigung dieser Präparate mit kleinen Mengen von Co-Zymase beruht.

Die Co-Zymase ist, wie Myrbäck zeigen konnte, eine spezifische Adenylsäure. Die Adenosintriphosphorsäure ist eine Adenylsäure die zwei Phosphorsäurereste addiert hat, aber diese Adenylsäure ist laut Lohmann in den von ihm dargestellten Präparaten nicht Co-Zymase, sondern Muskeladenylsäure. Von Euler und Myrbäck (8) haben früher gezeigt, daß die Muskeladenylsäure die Co-Zymase als Co-Ferment für die Alkoholgärung nicht ersetzen kann. Bei der Milchsäurebildung in Muskelextrakt vermag sie dagegen laut Lohmann (7) in gewissem Maße, und analog mit der Co-Zymase, die Adenosintriphosphorsäure zu ersetzen, wobei sie zwei Phosphorsäurereste aufnimmt und in Adenosintriphosphorsäure übergeht.

Bei der von mir studierten Hexosediphosphorsäurespaltung in Muskelextrakt in Zusammenhang mit der Mb-Entfärbung hat die Muskeladenylsäure keine Aktivatorwirkung (Versuch Ia).

Nun könnte allerdings diese Spaltung von Hexosediphosphorsäure unter dem Einfluß von Muskelextrakt in Gegenwart von Co-Ferment und Mb, wenn man Neubergs Standpunkt in bezug auf den Abbauverlauf einnimmt, größere Ähnlichkeiten mit der Alkohol- als mit der Milchsäuregärung haben. Laut Hahn und Haarman (3) führt die Spaltung von Hexosediphosphorsäure unter ähnlichen Bedingungen zur Bildung von Brenztraubensäure, die laut Neuberg bekanntlich ein Intermediärprodukt bei der Alkoholgärung ist (siehe auch Case und Cook). Die Milchsäurebildung soll nach Neuberg direkt aus dem bei der Hexosespaltung entstandenen Methylglyoxal ohne vorherige Oxydation zu Brenztraubensäure erfolgen. Beiden Prozessen, der Milchsäure- und der Alkoholgärung, würde demnach laut Neuberg die Spaltung der Hexose zu Methylglyoxal gemeinsam sein.

Die in dieser Arbeit studierte Spaltung der Hexosediphosphorsäure würde sich also eventuell dadurch von der Milchsäuregärung unterscheiden können, daß ein Oxydationsmoment hinzugekommen ist. Man kann sich hierbei natürlich vorstellen, daß die Adenosintriphosphorsäure laut Lohmann und die Muskeladenylsäure nur die Spaltung von Hexosediphosphorsäure zu Methylglyoxal[1] beeinflussen können, während die Co-Zymase überdies das Vermögen hat, als Oxydationskatalysator aufzutreten. Die Zwischenstellung, welche die nach Fiske dargestellte Adenosintriphosphorsäure einnimmt, kann man dann mit von Euler durch eine Verunreinigung dieses Präparates mit Co-Zymase erklären.

Diese Erklärung der Eigenschaften der nach Fiske dargestellten Adenosintriphosphorsäure ist jedoch nicht die einzige, mit diesen Ausgangspunkten mögliche. Mindestens ebenso natürlich erscheint mir die Annahme, daß es zwei Adenosintriphosphorsäuren gibt, die in gleichen Beziehungen zueinander stehen wie die Muskeladenylsäure und die Co-Zymase. Lohmanns Adenosintriphosphorsäure würde solchenfalls phosphorylierte Muskeladenylsäure sein, während Fiskes größere oder kleinere Mengen von phosphorylierter Co-Zymase zusammen mit einer inaktiven, phosphorylierte Adenylsäure (Muskeladenylsäure) enthalten würde. [In meinen früher besprochenen Versuchen mit Pflanzensamenextrakten war der Unterschied in der Aktivatorwirkung von Co-Zymase und Adenosintriphosphorsäure oft so gering, daß die von von Euler angenommene Verunreinigung mit Co-Zymase sehr erheblich sein muß, um den Effekt der Adenosintriphosphorsäure erklären zu können. Dies kann er aber kaum

[1] Mit Hinsicht auf die früher besprochene Spontandehydrierung von Methylglyoxal doch sehr unwahrscheinlich.

sein, denn Co-Zymase wird von den bei der Darstellung der Adenosintriphosphorsäure verwendeten Fällungsmitteln kaum mitgefällt. Die Analysen der verwendeten Adenosintriphosphorsäure (siehe Kap. V) geben auch keinen Anhaltspunkt für die Annahme, daß dieses Präparat erhebliche Mengen an Verunreinigungen enthalten sollte.]

Wenn die Annahme, daß in Fiskes Adenosintriphosphorsäure eine phosphorylierte Co-Zymase vorkommt, richtig ist, so erhält man zwei kongruente Systeme, von denen das eine eventuell die Spaltung von Hexosediphosphorsäure zu Milchsäure beeinflussen würde (Muskeladenylsäure-Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus), während das andere eine oxydative Hexosediphosphorsäurespaltung oder Alkoholgärung herbeiführen könnte (Co-Zymase—Adenosintriphosphorsäure vom Fiskeschen Typus).

Dieser Gedankengang ist stichhaltig, solange man Neubergs Standpunkt teilt, daß die Milchsäure aus Methylglyoxal gebildet wird, ohne daß irgendeine vorhergehende Oxydation notwendig erscheint. Schließt man sich dagegen Embdens neuer Ansicht an, daß die Milchsäurebildung durch Reduktion von primär gebildeter Brenztraubensäure erfolgt, so stößt man auf erhebliche Schwierigkeiten. Nach Embdens Theorie wird nämlich die Spaltung der Hexosediphosphorsäure bei der Milchsäure- und der Alkoholgärung bis zu Brenztraubensäure ähnlich verlaufen, und es wäre dann sehr schwer zu erklären, warum für die verschiedenen Spaltungsformen verschiedene Co-Fermente existieren sollten. Ein Oxydationsmoment kommt ja nach dieser Theorie in beiden Fällen (Milchsäure- und Alkoholbildung) vor.

Wenn man indessen von Anfang an voraussetzt, daß die Annahme des Vorkommens eines Systems Co-Zymase—Adenosintriphosphorsäure nach Fiske[1] richtig ist, so fragt man sich natürlich, was für eine Funktion dieses System haben kann. Es ist auffallend, daß sowohl die Hexosediphosphorsäure, bei deren Spaltung das System mitwirkt, wie die Adenosintriphosphorsäure paarige Phosphorsäurereste enthalten, die während des intermediären Stoffwechsels wahrscheinlich leicht abgespalten und wiederhergestellt werden können. Man kann daher an die Möglichkeit denken, daß die Co-Zymase im Spaltungsaugenblick der Hexosediphosphorsäure die Phosphorsäurereste derselben übernimmt, wobei eine Adenosintriphosphorsäure gebildet wird. Einige experimentelle

[1] Unter Adenosintriphosphorsäure nach Fiske wird in diesem Zusammenhange phosphorylierte Co-Zymase verstanden, was nicht ganz richtig ist, da die nach Fiske dargestellten Präparate wahrscheinlich immer eine Mischung dieser Adenosintriphosphorsäure und der Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus enthalten.

Tatsachen sprechen dafür, daß es sich wirklich so verhält (Versuch 22a und b) [siehe auch Holmberg (4)].

Ein Karbonatextrakt aus stark ausgewaschener Muskulatur von neutraler Reaktion, das weder anorganisches noch leicht hydrolysierbares Phosphat in nachweisbaren Mengen enthält, vermag also aus zugesetzter Co-Zymase und Hexosediphosphorsäure in kurzer Zeit nachweisbare Mengen von leicht hydrolysierbarem Phosphat zu synthetisieren. Es kann nachgewiesen werden, daß dieser Extrakt praktisch frei von Phosphatasen, die bei neutraler Reaktion wirksam sind, ist (Versuche 23 und 24). [Wird die Reaktion im Muskelextrakt alkalisch (p_H 7·5 bis 8), so entfalten die im Extrakt noch vorhandenen Phosphatasen ihre volle Wirksamkeit, und man erhält kein leicht hydrolysierbares Phosphat, sondern im Gegenteil nur anorganisches.]

Lehnartz glaubt gezeigt zu haben, daß nach Zusatz von Muskeladenylsäure eine schnelle Vermehrung der leicht hydrolysierbaren Phosphatfraktion im Muskelpreßsaft erhalten wird. Eine Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat aus Hexosediphosphorsäure und Muskeladenylsäure habe ich dagegen unter ähnlichen Bedingungen wie im Versuch 22 nicht nachweisen können (Versuch 27).

Nun ist zu beachten, daß die Bildung von Adenosintriphosphorsäure aus Adenylsäure eine endotherme Reaktion ist. Laut Meyerhof und Lohmann (3) werden nämlich bei der Spaltung von einem Mol Adenosintriphosphorsäure unter Bildung von Adenylsäure und freiem Phosphat 25000 cal freigemacht. Diese Verfasser sind der Ansicht, daß die für die Synthese erforderliche freie Energie aus der Milchsäurebildung erhalten wird. Die Bildung von zwei Mol Milchsäure aus Glykogen soll nämlich etwa 37400 cal ergeben, was genügen würde. Auch die Milchsäurebildung aus Hexosediphosphorsäure würde laut diesen Verfassern eine hinlängliche Energiequelle darstellen. Bei der Bildung von Hexosediphosphorsäure aus Glykogen würden nämlich nur ungefähr 15 Proz. des früher erwähnten Energiegehaltes frei werden. Die Versuche, die dies zeigen sollen, sind jedoch sehr unbefriedigend, da sie mit fluoridvergiftetem Muskelextrakt ausgeführt worden sind, und da deshalb die gebildete „Hexosediphosphorsäure" vom Lohmannschen „schwer hydrolysierbaren Typus", also wahrscheinlich Glyzerinsäurephosphorsäure gewesen ist.

Bei Versuchen zur Errichtung einer Energiebilanz für die Milchsäuregärung und die Adenosintriphosphorsäuresynthese haben Meyerhof und Lohmann (3) auch in mehreren Fällen, in denen sie von den hier wiedergegebenen Zahlen ausgingen, eine negative Bilanz erhalten.

Dadurch, daß man annimmt, daß die Synthese der Adenosintriphosphorsäure nach Fiske durch eine Reaktion zwischen Hexose-

diphosphorsäure und Co-Zymase zustande kommt, erhält man eine greifbare Erklärung dieses Vorganges, was Lohmann für die Synthese seiner Adenosintriphosphorsäure „mit Hilfe der bei der Milchsäurebildung freigemachten Energie" nicht geben kann.

Bei meinen früheren Versuchen [Holmberg (4)] gelang die Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat nur in Gegenwart von Mb. Ich schloß daraus, daß eine Oxydation stattfinden müsse, um die Energie zu der Adenosintriphosphorsäuresynthese zu liefern. Als ich später diese Versuche viele Male wiederholte, stellte es sich aber heraus, daß die Reaktion oft auch stattfindet, ohne daß Mb zugesetzt wird. Ich habe auch bemerkt, daß die Mb-Reduktion in Parallelversuchen nicht schnell genug verläuft, um eine mit der Adenosintriphosphorsäuresynthese äquivalente Dehydrierung zu gestatten. Da der Dehydrierungsprozeß beim Spalten von Hexosediphosphorsäure in Gegenwart von Co-Zymase ein anoxytroper ist (in dem Mikrorespirometer erhält man keine Sauerstoffaufnahme), scheint es also, als ob die anoxydative Spaltung der Hexosediphosphorsäure (Milchsäurebildung?), wie Meyerhof und Lohmann annehmen, genügend Energie lieferte, um eine Adenosintriphosphorsäuresynthese zu ermöglichen. Wie die zuweilen auftretende katalysierende Wirkung von Mb zu erklären ist, ist nicht leicht zu sagen. Wenn man mit Ohle annimmt, daß die Spaltung der Hexosediphosphorsäure mit einer Dehydrierung beginnt, die dann durch eine Hydrierung eines der Spaltprodukte kompensiert wird, so ist es jedoch nicht schwer zu begreifen, daß ein Dehydrierungsmittel wie Mb die Reaktion im Anfang fördern kann.

Nach dem vorher Gesagten halte ich es für berechtigt, folgende Arbeitshypothese anzunehmen: Es besteht ein Co-Fermentsystem für den Kohlehydratstoffwechsel in der Muskulatur von der Zusammensetzung Co-Zymase–Adenosintriphosphorsäure von Fiskeschem Typus. Dieses Co-Fermentsystem tritt bei der Spaltung von Hexosediphosphorsäure in Funktion. Es fungiert als Speicherplatz für vom energetischen Gesichtspunkt aus hochwertige Phosphorsäure, die mit Hilfe der bei der Spaltung der Hexosediphosphorsäure freigemachten Energie aufgebaut wird.

Es verbleibt nun die Aufgabe zu untersuchen, ob es möglich ist, Lohmanns und Lehnartz's Beobachtungen mit der Lohmannschen Adenosintriphosphorsäure und mit der Muskeladenylsäure mit dieser Hypothese zu vereinigen. [Deuticke (1) hat übrigens auch eine Aktivierung der Methylenblau-Entfärbung mit Muskeladenylsäure in Extrakte aus mäßig ausgewaschener Muskulatur erhalten.]

Hierbei ist zuerst zu beachten, daß Lohmann, Lehnartz und Deuticke mit einem Enzymmaterial gearbeitet haben, das bedeutend mehr zusammengesetzt gewesen ist als das von mir verwendete (Muskelpreßsaft und Extrakt aus ungewaschener oder wenig gewaschener

Muskulatur). Es ist daher wohl möglich, daß sie stets größere oder kleinere Mengen Co-Zymase oder Adenosintriphosphorsäure vom Fiskeschen Typus gegenwärtig gehabt haben. Es hat mich daher interessiert zu untersuchen, wie sich ein Extrakt aus stark ausgewaschener Muskulatur bei gleichzeitigem Zusatz von Co-Zymase und Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus verhält.

Bevor ich auf die Versuche eingehe, die ich zur Untersuchung der Wirkung solcher Kombinationen ausgeführt habe, will ich über einige andere Versuche berichten, die für das Verständnis der mit den Kombinationen hervorgerufenen Effekte von Bedeutung sind.

Bei den Versuchen, die mit der nach Fiske dargestellten Adenosintriphosphorsäure ausgeführt worden sind, hat sich herausgestellt, daß sie imstande ist, eine Mb-Entfärbung nicht nur in Kombination mit Hexosediphosphorsäure, sondern auch zusammen mit Milchsäure hervorzurufen [siehe Holmberg (1)].

Später zeigte sich, daß auch die Kombination Adenosintriphosphorsäure Fiske–Apfelsäure eine Mb-Entfärbung mit Muskelextrakt hervorrufen konnte (Versuch 3).

Auch die in diesen beiden Fällen mit Adenosintriphosphorsäure erhaltene Co-Fermentwirkung konnte mit wenigstens gleicher Intensität mit reiner Co-Zymase hervorgerufen werden. Die Muskeladenylsäure und die nach Lohmann dargestellte Adenosintriphosphorsäure sind dagegen hier, ebenso wie bei der Hexosediphosphorsäurespaltung ganz wirkungslos (Versuch 1b).

Es scheint demnach, als ob ein Phosphatextrakt aus stark ausgewaschener Muskulatur wenigstens drei verschiedene Fermente enthalten müßte, denen, um wirken zu können, eine der Komponenten im Co-Zymasesystem zur Verfügung stehen muß.

Bekanntlich hat Szent-Györgyi aus Muskulatur eine Substanz isoliert, die er als Co-Ferment der Milchsäureoxydation auffaßt. Ich habe von Szent-Györgyi einige Proben dieser Substanz erhalten, und es zeigte sich, daß sie bei meinen Versuchen mit der Co-Zymase vollkommen gleichartige Wirkung hatte, indem sowohl die Hexosediphosphorsäurespaltung wie die Milchsäure- und Apfelsäuredehydrierung aktiviert wurden (Versuch 2).

Meiner Ansicht nach bestehen demnach gute Gründe für die Annahme, daß Szent-Györgyis Co-Ferment mit der Co-Zymase identisch oder wenigstens sehr nahe mit ihr verwandt ist. (Es enthält kein leicht hydrolysierbares Phosphat, ergibt aber nach Angaben von Szent-Györgyi Reaktionen, die für Adenylsäuren charakteristisch sind.)

Selbst habe ich aus Erbsen ein Co-Fermentpräparat dargestellt, das mit der Co-Zymase analoge Wirkungen hat und das kein leicht hydrolysier-

bares Phosphat enthält. Auch dieses Präparat dürfte daher Co-Zymase enthalten (Versuch 4) [siehe übrigens Holmberg (2)].

Ich kehre nun zur Muskeladenylsäure und zur Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus zurück. Wenn man den Einfluß dieser Stoffe auf die Hexosediphosphorsäurespaltung und die Milchsäuredehydrierung bei Gegenwart einer der oben genannten, als Co-Ferment wirksamen Substanzen studiert, so findet man folgendes: Die Muskeladenylsäure und Lohmanns Adenosintriphosphorsäure hemmen beide die Milchsäuredehydrierung, beschleunigen aber die Hexosediphosphorsäurespaltung (Versuch 5a, b, c).

Wie soll dieser Antagonismus erklärt werden? Ich habe an folgende Möglichkeit gedacht. Die Hemmung der Milchsäuredehydrierung beruht auf einer Verdrängung. Das aktive Co-Zymasemolekül und die inaktive Muskeladenylsäure sind so gleichartig gebaut, daß sie sehr wohl Affinität zum gleichen Enzym haben können. Aus Gründen, die weiter unten näher klargelegt werden sollen, erscheint es indessen wahrscheinlich, daß die Affinität der Milchsäuredehydrogenase gegen den in der Adenylsäure vorkommenden Phosphorsäurerest gerichtet ist. Dadurch, daß die Muskeladenylsäure mit der Co-Zymase um die Milchsäuredehydrogenase konkurriert, wird von diesem Enzym etwas Co-Zymase freigemacht. Die so freigemachte Co-Zymase wird vom hexosediphosphorsäurespaltenden Enzym übernommen. Eine Affinität dieses Enzyms, Neubergs Glykolase, scheint auf eine für die Co-Zymase spezifische Atomgruppe gerichtet zu sein, so daß die Muskeladenylsäure hier keine Verdrängung bewirken kann.

Wenn diese Auslegung betreffs der Verdrängung der Co-Zymase richtig ist, und sie wird weiter durch gewisse Beobachtungen in bezug auf die Wirkung von Arsenat, Arsenit und Orthophosphat gestützt, die weiter unten beschrieben werden sollen, so könnte man sich folgende Erklärung für die von Lohmann beobachtete Milchsäurebildung im Muskelextrakt nach Zusatz von Muskeladenylsäure oder Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus denken: Eine in Muskelextrakt vorhandene Co-Zymasemenge, die an die Milchsäuredehydrogenase gebunden gewesen war, wird für die Hexosediphosphorsäurespaltung mobilisiert, während die Milchsäurespaltung gleichzeitig gehemmt wird. Lehnartz's Beobachtung, daß eine Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat in Muskelpreßsaft nach Zusatz von Muskeladenylsäure eintritt, würde auch einen gleichartigen Erklärungsgrund haben können, ebenso wie Deutickes Aktivierung der Methylenblau-Entfärbung in Muskelextrakt durch Muskeladenylsäure.

Da Myrbäck, von Euler und Hellström (1) beobachtet haben, daß die Co-Zymase leicht in eine inaktive Adenylsäure umgelagert wird, die mit der Muskeladenylsäure große Ähnlichkeit hat, erscheint es nicht

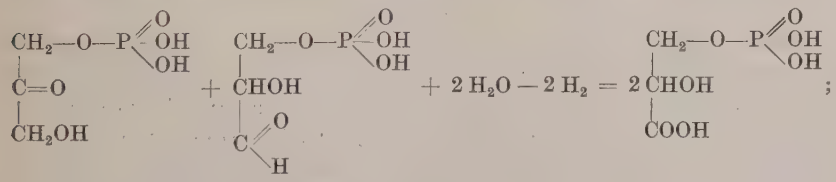
undenkbar, daß die Muskeladenylsäure und die Adenosintriphosphorsäure vom Lohmannschen Typus Kunstprodukte sind, und daß die Co-Zymase das gemeinsame Co-Ferment für Alkohol- und Milchsäuregärung und für die Milchsäure- und Kohlehydratoxydation darstellt.

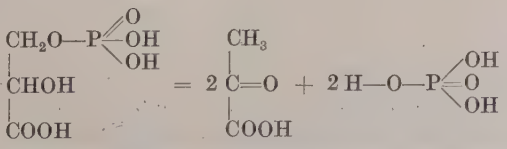
Es scheint mir einfacher, die Sache auf diese Weise zu sehen, als das Vorkommen zwei verschiedener Co-Fermentsysteme (und Fermente) in der Muskelzelle anzunehmen, von denen das eine bei der Milchsäurebildung, das andere bei der Oxydation der Hexose fungieren sollte. Es ist unbestreitbar schwer, sich vorzustellen, wie in der Muskelzelle eine Umkuppelung von dem einen (dem milchsäurebildenden) zu dem anderen (dem oxydierenden) nur durch Variationen in der Sauerstoffzufuhr vor sich gehen sollte.

Lipmann (3) hat zwar eine neue Theorie vorgelegt, nach welcher „das glykolysierende Enzym" durch Oxydation reversibel inaktiviert werden könnte, aber die von Lipmann bisher vorgebrachten Beweise für diese Theorie sind nicht bindend. Lipmanns Versuchsresultate können mit dem Ausgangspunkt von Embdens Theorie einfach folgendermaßen gedeutet werden: Wenn Lipmann das Redoxpotential eines Muskelextraktes durch Zusatz eines positiven Redoxindikators erhöht, werden die für die Milchsäurebildung notwendigen Reduktionsprozesse gestört (es wird keine Glyzerinphosphorsäure gebildet, und Brenztraubensäure wird nicht zu Milchsäure reduziert).

Da der Muskelextrakt keine Carboxylase enthält, wird daher Brenztraubensäure angesammelt, die durch Giftwirkung, größere Affinität zum Enzym oder auf andere Weise hemmend auf den Abbauprozeß einwirkt.

Ich will, um dies ganz klarzumachen, ein hypothetisches Abbauschema geben. Ich gehe von den nach Embden primär entstandenen Triosephosphorsäuren (siehe S. 13) aus:





In Gegenwart eines Wasserstoffakzeptors von höherem Redoxpotential als Dioxyazetonphosphorsäure werden beide Triosephosphorsäuren zu Glyzerinsäurephosphorsäure dehydriert. Diese zerfällt dann

in Brenztraubensäure und Orthophosphorsäure. Dieses Abbauschema kann ebensogut für die Kohlehydratoxydation in der Muskelzelle als für die Alkoholgärung gelten. Der einzige Unterschied liegt in dem Wasserstoffakzeptor. In der Hefe ist der Wasserstoffakzeptor Acetaldehyd, in der Muskelzelle eine von den vielen hier vorhandenen Redoxsystemen („das gelbe Atmungsferment, Zytochrom usw.").

Wie lassen sich nun meine Beobachtungen über die Wirkungsweise der Co-Zymase mit Embdens Theorie vereinen?

Wenn man annimmt, daß sämtliche Teilprozesse bis zu einer vollständigen Dephosphorylierung während der Periode vor sich gegangen sind, wo Co-Zymase und Spaltstücke an demselben Ferment gebunden sind, so hindert ein stufenweiser Abbau natürlich nicht, daß die Phosphorsäurereste auf die Co-Zymase übergehen. Eine Schwierigkeit liegt darin, daß die Reduktion der Brenztraubensäure zu Milchsäure unter gleichzeitiger Oxydation von Glyzerinphosphorsäure stattfinden soll. Wahrscheinlich wäre es ja, daß die Reduktion der Brenztraubensäure unter Einwirkung der Laktikodehydrogenase vor sich gehen sollte. Wie es sich hiermit verhält, bleibt noch abzusehen, möglicherweise kann die Brenztraubensäure auch durch die Glykalose zu Milchsäure reduziert werden.

Bei der oxydativen Hexosespaltung erheben sich natürlich keine Bedenklichkeiten dieser Art.

Wenn Embdens Theorie richtig ist, kann es natürlich nur die Glyzerinsäurephosphorsäure sein, die ihren Phosphorsäurerest auf die Co-Zymase überliefert.

Nun stelle ich mir vor, daß, wenn der Mechanismus, der zur Dephosphorylierung von Adenosintriphosphorsäure unter Bildung von freier Co-Zymase dient, in irgendeiner Weise schadhaft ist, so daß phosphorylierte Co-Zymase als Co-Ferment bei der Hexosediphosphorsäurespaltung auftreten muß, so kann diese eine Spaltung der Hexosediphosphorsäure zu Triosephosphorsäuren bewirken, aber die Spaltstücke können nicht dephosphoryliert werden. Das kann bei Embdens Versuchen der Fall sein, denn Barrenscheen und Lang haben gezeigt, daß Fluorid die von Jacobsen nachgewiesene spezifische Adenosintriphosphorsäurephosphatase hemmt. Auch bei Lipmanns und Lohmanns Versuchen mit verdünntem Muskelextrakte ist eine solche Schädigung nicht unmöglich.

Nun sind die von mir verwendeten Muskelextrakte wie früher erwähnt worden ist, sehr arm an wirksamen Phosphatasen. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß bei der Spaltung von Hexosediphosphorsäure Adenosintriphosphorsäure angesammelt wird. Da aber mit kleinen Mengen von Adenosintriphosphorsäure nach Fiske durch diese Extrakte große Mengen Hexosediphosphorsäure unter Entfärbung von Mb gespalten werden können, so kann man annehmen, daß hier eine Spaltung

zu Phosphorsäureester mit drei Kohlenstoffatomen stattfindet. Ich habe deshalb einige Versuche ausgeführt, um zu sehen, ob wirklich schwer hydrolysierbare Phosphorsäureester beim Einwirken dieser Muskelextrakte auf Hexosediphosphorsäure gebildet werden. Dabei wollte ich auch einen Versuch machen, zu untersuchen, ob eine solche Esterbildung wirklich nur in Gegenwart von Co-Zymase- oder richtiger gesagt, aus Co-Zymase gebildete Adenosintriphosphorsäure vor sich geht, und ob sie aerob und anaerob gleich verläuft. Es zeigte sich (Versuche 28, 29, 30), daß eine Bildung von schwer hydrolysierbaren Estern aus Hexosediphosphorsäure unter Einfluß von Muskelextrakt in Gegenwart von Co-Zymase nachgewiesen werden konnte. Diese Esterbildung konnte sowohl unter aeroben Verhältnissen in Gegenwart von Mb, als auch unter anaeroben Verhältnissen ohne Mb nachgewiesen werden. Wenn keine Co-Zymase zugesetzt wurde, konnte keine Spaltung der Hexosediphosphorsäure festgestellt werden. Muskeladenylsäure vermochte die Spaltung nicht zu aktivieren.

Diese Versuche ergeben also Belege für meine Annahme, daß die Spaltung der Hexosediphosphorsäure auch unter anaeroben Bedingungen nur in Gegenwart des Systems Co-Zymase–Adenosintriphosphorsäure vom Fiskeschen Typus stattfindet. Die Muskeladenylsäure hat unter keinen Umständen Co-Fermentwirkung. Sie zeigen auch, daß die Bildung von schwer hydrolysierbarem Phosphorsäureester aus Hexosediphosphorsäure als Zeichen einer Co-Fermentinsuffizienz aufgefaßt werden kann. Die phosphorylierte Co-Zymase hat noch das Vermögen, Hexosediphosphorsäure zu spalten, vermag aber nicht die Spaltstücke zu dephosphorylieren.

Meiner Annahme, daß die Co-Zymase das einzige Co-Ferment für die Hexosediphosphorsäurespaltung ist, wird also durch diese Versuche nicht wiedersprochen.

Erfährt die Hexosediphosphorsäure eine direkte Spaltung oder besteht Anlaß zu der Vermutung, daß ihre Spaltung über einen Monoester erfolgt?

Die im vorstehenden geschilderten Versuche sprechen allerdings in hohem Grade dafür, daß die Hexosediphosphorsäure eine direkte Spaltung erleidet. Die Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat aus Hexosediphosphorsäure und Co-Zymase unter dem Einfluß von Muskelextrakt, dem das Vermögen fehlt, zugesetzte Hexosediphosphorsäure zu dephosphorylieren, kann wohl kaum auf andere Weise erklärt werden. Ich habe aber auch untersucht, ob unter gleichen Bedingungen eine Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat aus Robisons Ester und Co-Zymase zustande kommt, aber es scheint nicht so (Versuch 25).

Die von mir benutzten Muskelextrakte sind nicht imstande, eine nennenswerte Mb-Entfärbung bei gleichzeitigem Zusatz von Co-Zymase und Robisons Ester hervorzurufen. Meyerhof hat seinerzeit bezüglich der Milchsäurebildung ähnliche Beobachtungen gemacht. Er konnte Extrakte erhalten, die Milchsäure aus Hexosediphosphorsäure, aber nicht aus Hexosemonophosphorsäure erzeugen konnten. Diese Erscheinung suchte er durch die Annahme zu erklären, daß in diesen Extrakten eine starke Zerstörung von Co-Ferment stattgefunden habe. Der normale Abbau von Hexosemonophosphorsäure würde mehr Co-Ferment erfordern, als der abnorme Abbau von Hexosediphosphorsäure, welch letzterer daher trotz alledem fortgehen könnte. Wenn diese Annahme von Meyerhof richtig ist, so würde eine Zunahme der Co-Fermentkonzentration eine Zunahme der Hexosemonophosphorsäureumsetzung von solcher Stärke hervorrufen, daß sie die Hexosediphosphorsäurespaltung weit übertreffen wird. Dies ist indessen nicht der Fall. Bei einer Verzehnfachung der Co-Zymasekonzentration erhält man nur eine unbedeutende Aktivierung der trägen Mb-Entfärbung mit Hexosemonophosphorsäure (Versuch 6).

Dieser Versuch und Versuche 7 und 8 zeigen auch einen anderen Effekt von Interesse. Bei Zusatz einer geeigneten Menge von Magnesiumchlorid erhält man eine deutliche Zunahme der mit der Kombination Co-Zymase–Hexosemonophosphorsäure erhaltenen Mb-Entfärbung, während ein Mg-Zusatz auf die mit der Kombination Co-Zymase–Hexosediphosphorsäure erhaltene Entfärbung wie auf die Milchsäuredehydrierung eine gewisse Hemmung ausübt. Lohmann ist bekanntlich der Ansicht, daß das Mg-Ion einen notwendigen Bestandteil im Co-Fermentkomplex der Milchsäurebildung darstellt, und von Euler und Mitarbeiter haben gezeigt, daß Mg auch große Bedeutung für die Alkoholgärung hat. Nach Lohmanns Auffassung wirken die Adenosintriphosphorsäure und das Mg-Ion bei demselben chemischen Prozeß, nämlich der Bildung der labilen Monoester, mit. (Lohmann hat in einigen Versuchen gezeigt, daß Magnesiumchlorid die Milchsäurebildung aus Hexosediphosphorsäure beschleunigt. Diese Versuche sind aber sicher nicht rein, denn die Extrakte haben notwendigerweise Glykogen enthalten.) Die oben besprochenen Versuche deuten indessen nicht auf ein direktes Zusammenwirken zwischen der Co-Zymase und dem Mg-Ion. Statt dessen läßt sich das hier erhaltene Resultat gut erklären, wenn man mit Erdtmann (1, 2) annimmt, daß das Mg-Ion als Co-Ferment für Phosphatasen (esen) zu fungieren vermag. In gleicher Weise wird die geringe Wirkung meines Muskelextraktes auf Robisons Ester in natürlicher Weise durch die Annahme erklärt, daß der geringe Gehalt an Phosphatase (ese) dieses Extraktes eine Phosphorylierung der Hexosemonophosphorsäure zu Hexosediphosphorsäure unmöglich macht. Durch Zusatz des Co-Fermentes Magnesium in optimaler

Konzentration kann eine gewisse Reaktivierung der noch vorhandenen Phosphatase erreicht werden, aber diese ist infolge des Mangels an Enzym begrenzt.

Ich habe auch einige Versuche angestellt, um die Mb-Entfärbung unter dem Einfluß von Muskelextrakt auf die Kombination Co-Zymase–Glykogen zu untersuchen. Auch hier hatte der Zusatz eines Mg-Salzes eine deutlich aktivierende Wirkung, aber der erhaltene optimale Effekt war nicht sehr groß. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen also auch dafür, daß das Mg-Ion für die Phosphorylierung von Bedeutung ist, da aller Wahrscheinlichkeit nach der Abbau von Glykogen, der sich durch Reduktion von Mb ausdrückt, über eine phosphorylierte Hexose verläuft (Versuch 7).

In diesem Zusammenhang sind einige nicht veröffentlichte Versuche von Thunberg mit Extrakten aus Pflanzensamen von Interesse. Thunberg hat nämlich gefunden, daß Extrakte aus einigen Pflanzensamen, wie aus Cucumis sativa, Echinocystis lobata und Sicyos angulata, nach Zusatz von Robisons Ester Mb reduzieren. Diese Samen reduzieren sämtlich Mb auch nach Zusatz von Glykogen. Mg-Salze beschleunigen in beiden Fällen die Entfärbung. Die große Mehrzahl aller von Thunberg untersuchten Samen, mit denen Robisons Ester keine Entfärbung von Mb herbeizuführen vermag, reagieren auch nicht auf Glykogen. Viele dieser Samen zeigen dagegen, wie Thunberg (2) früher gezeigt hat, eine schnelle Mb-Entfärbung nach Zusatz von Hexosediphosphorsäure. Es scheint also, als ob gewisse Samen (z. B. Cucumis) aktive Phosphatasen enthalten, andere (z. B. Corchorus) dagegen nicht.

Welche Wirkung haben Arsenat und Arsenit, Fluorid und Monobromazetat auf die Spaltung der Hexosediphosphorsäure?

Meyerhof (3) hat bekanntlich nachgewiesen, daß Arsenat einen aktivierenden Einfluß auf die von ihm als unphysiologisch betrachtete Hexosediphosphorsäuregärung hat und Macfarlane hat diese Beobachtung bestätigen können. Diese Aktivierung kommt sowohl bei der Alkohol- wie bei der Milchsäuregärung vor. Sie wird mit sehr kleinen Arsenatkonzentrationen erhalten, die jedoch bei verschiedenem Enzymmaterial variieren. Bei stärkeren Arsenatkonzentrationen entsteht immer Hemmung.

Harden und Young (5) haben früher im Anschluß an Buchner und Rapp gezeigt, daß Arsenit eine ähnliche, wenngleich schwächere Wirkung hat.

Daß Arsen einen hemmenden Einfluß auf die Oxydationsprozesse der Organismen hat, ist seit mehreren Jahren durch Untersuchungen über

die Einwirkung von Arsenmedikamentation auf den Grundumsatz bekannt.

In letzterer Zeit haben Szent-Györgyi und seine Mitarbeiter einige Arbeiten veröffentlicht, welche zeigen, daß einige Oxydationsprozesse in der Muskulatur von Arsenit in kleinen Konzentrationen gehemmt werden. Es scheint sich hierbei um jene Prozesse zu handeln, die durch das von Szent-Györgyi isolierte Co-Ferment katalysiert werden, also hauptsächlich um die Milchsäureoxydation.

Da in den von mir verwendeten Muskelextrakten die Milchsäuredehydrogenase und das hexosediphosphorsäurespaltende Ferment nebeneinander vorkommen, bilden diese Extrakte offenbar ein geeignetes Material für ein Studium dieser Prozesse.

Zuerst wurde ein Versuch mit Natriumarsenit in Konzentrationen gemacht, die denjenigen von Szent-Györgyi entsprachen (etwa 0·01 bis 0·04 Mol). Hierbei zeigte sich, daß man eine gewisse Hemmung der Milchsäuredehydrierung in voller Übereinstimmung mit Szent-Györgyis Beobachtung erhielt. Im gleichen Extrakt bekam man eine Beschleunigung der Hexosediphosphorsäurespaltung, die laut den Angaben von Meyerhof und Harden zu erwarten war und die schon bei den größten hier verwendeten Verdünnungen optimal war (Versuch 9). Diese entgegengesetzte Wirkung auf Milchsäureoxydation und Hexosediphosphorsäurespaltung war noch deutlicher, wenn das Arsenit durch Arsenat ersetzt wurde (Versuch 10). Auch hier war die Beschleunigung der Hexosediphosphorsäurespaltung schon mit 0·01 Mol Lösung von Arsenat optimal. Bei größeren Konzentrationen wurde sie weniger ausgeprägt. Die schon von Harden beobachtete Hemmungswirkung machte sich geltend.

Diese beiden Versuche wurden mit Phosphatextrakt aus ausgewaschener Muskulatur von dem von mir in allgemeinen verwendeten Typus ausgeführt. Da Phosphatextrakte für einige Zwecke nicht sehr geeignet sind, habe ich auch phosphatfreie Extrakte durch Extraktion der Muskulatur mittels Wasser zubereitet, das durch Zusatz einer geringen Menge von Kaliumkarbonat schwach alkalisch gemacht worden war. Die auf diese Weise erhaltenen Extrakte haben eine gute Enzymwirkung, aber ich glaube wiederholt festgestellt zu haben, daß sie sich von den Phosphatextrakten dadurch unterscheiden, daß die Stärke des hexosediphosphorsäurespaltenden Enzyms im Vergleich mit der der Milchsäuredehydrogenase herabgesetzt ist. In solchen Wasserextrakten ist die Arsenatwirkung noch deutlicher als in Phosphatextrakten (Versuch 11). Wie aus dem hier mitgeteilten Versuch hervorgeht, ist die Arsenatwirkung schon mit 0·001 Mol Arsenatlösung deutlich. In diesem Versuch habe ich ziemlich verdünnte Co-Zymase verwendet. Wenn größere Mengen Co-Zymase bei gleichbleibender Arsenatkonzentration

zugesetzt wurden, wurde die Arsenatwirkung weniger ausgeprägt. Wurde die Co-Zymasemenge verzehnfacht, verschwand sie ganz.

Im Gedanken an die nahe chemische Verwandtschaft zwischen Phosphor und Arsen liegt es nahe, sich vorzustellen, daß der Unterschied zwischen den Wasserextrakten und den Phosphatextrakten darauf beruhen könnte, daß das Phosphat die anwesenden Enzyme in ähnlicher Weise wie das Arsenat beeinflußt. In der Tat stellt sich auch heraus, daß ein Zusatz von Phosphat zu einem Wasserextrakt eine gleichartige, wenn auch nicht ganz so ausgeprägte Wirkung wie ein Arsenatzusatz hat, d. h. die Milchsäuredehydrierung wird gehemmt und die Hexosediphosphorsäurespaltung wird beschleunigt (Versuch 12). Auch hier wird die Wirkung bei größeren Co-Zymasekonzentrationen weniger ausgeprägt.

Es ist klar, daß die Pufferung in den Karbonatextrakten nicht so gut ist wie in den Phosphatextrakten. Besonders hat natürlich die Evakuierung der Thunbergröhren eine gewisse p_H-Verschiebung nach der alkalischen Seite zur Folge, was ich jedoch dadurch zu beseitigen versuchte, daß ich den Muskelextrakt vor der Neutralisation unter Vakuum setzte. Die hier beobachteten Effekte von Arsenat und Phosphat können jedoch nicht durch eine p_H-Verschiebung erklärt werden, denn die beiden hier in Rede stehenden Enzyme, die Milchsäuredehydrogenase und das hexosediphosphorsäurespaltende Enzym, haben sehr ähnliche p_H-Wirkungskurven (Versuche 18, 19).

Wie ist dann dieser Antagonismus von Arsen und Phosphor in der Einwirkung auf diese Enzyme zu erklären? Wir kommen hier auf die gleiche Erscheinung zurück, die in den Versuchen mit Muskeladenylsäure und Adenosintriphosphorsäure nach Lohmann beobachtet worden ist. Die beiden Enzyme, die Milchsäuredehydrogenase und die Glykolase, arbeiten mit dem gleichen Co-Ferment, der Co-Zymase. Es ist demnach klar, daß ein Stoff, der dieses Co-Ferment von dem einen Enzym verdrängen kann, dadurch indirekt auf das andere aktivierend einwirken kann. Da die Co-Zymase einen Phosphorsäurerest enthält, liegt es nahe, sich die Sache so vorzustellen, daß die Co-Zymase durch diesen Phosphorsäurerest an die Milchsäuredehydrogenase gebunden wird, während die Bindung an das hexosediphosphorsäurespaltende Enzym anderer Art ist. Es ist dann sehr natürlich, sich die Verdrängung der Co-Zymase von der Milchsäuredehydrogenase durch Orthophosphat oder durch das nahe verwandte Arsenat vorzustellen.

Wenn man die Sache in dieser Weise betrachtet, kann man vielleicht auch eine Erklärung für das eigentümliche Verhältnis bekommen, daß Trockenhefe Milchsäure dehydrieren kann, auch nachdem alle Co-Zymase, dem verlorenen Gärvermögen nach zu urteilen, entfernt worden ist. Wenn die restierende Co-Zymase an die Laktikodehydrogenase fest ge-

bunden ist, kann natürlich keine Gärung zustande kommen, da Hexosediphosphorsäure nicht angegriffen werden kann. (Vgl. Hardens und Meyerhofs Beobachtungen, daß die Hexosediphosphorsäurevergärung durch Arsenat beschleunigt wird, im Vergleich mit den Beobachtungen von Szent-Györgyi, daß Arsenat die Oxydationsprozesse in Hefe hemmt.)

Die Wirkung von Fluorid auf die Kohlehydratspaltung ist ebenso wie die Arsenatwirkung ein ziemlich umstrittenes Kapitel. Nilsson hat gezeigt, daß in fluoridvergiftetem Hefeextrakt unter gewissen Bedingungen Glyzerinsäurephosphorsäure gebildet wird, und dasselbe hat von Embden und seinen Mitarbeitern für Muskelpreßsaft gezeigt werden können. Da den von mir verwendeten Extrakten auch ohne Fluoridzusatz die Fähigkeit fehlt, anorganisches Phosphat abzuspalten, so ist zu erwarten, daß ihre Funktion, was die Hexosediphosphorsäurespaltung betrifft, durch einen Fluoridzusatz nicht in nennenswertem Grade beeinflußt werden wird. Dies ist auch nicht der Fall. Auf die Milchsäuredehydrierung übt das Fluorid dagegen eine gewisse Hemmung aus (Versuche 13, 14).

Diese Versuche zeigen die Fluoridwirkung teils mit Adenosintriphosphorsäure nach Fiske als Co-Ferment, teils mit meinem aus Erbsen dargestellten Co-Fermentpräparat, das kein leicht hydrolysierbares Phosphat enthält, und das also mit großer Wahrscheinlichkeit mit der Co-Zymase identisch ist.

Die Fluoridwirkung ist in beiden Fällen identisch. Meine Resultate sind also mit den Beobachtungen von Nilsson und Embden gut vereinbar, nach denen die Fluoridvergiftung den Gärungsverlauf dadurch verhindert, daß sie die Dephosphorylierung der bei der Spaltung eines Hexosephosphorsäureesters entstandenen Moleküle mit drei Kohlenstoffatomen hemmt. Es wäre von Interesse, den näheren Mechanismus bei diesem Hemmungsprozeß klargelegt zu bekommen. Man kann sich, wie früher gesagt wurde, vorstellen, daß Fluorid dadurch wirkt, daß es die von Jacobsen nachgewiesene spezifische Adenosintriphosphorsäurephosphatase hemmt, was ja durch Barrenscheen und Lang nachgewiesen worden ist und von mir bestätigt werden kann, und daß dadurch indirekt eine Hemmung der Dephosphorylierung der Hexosediphosphorsäure zustande kommt.

Die schwache aber deutliche Hemmung der Milchsäuredehydrierung, die ich in meinen Versuchen immer habe nachweisen können, ist interessant, da Lipmann hat zeigen können, daß der durch Fluoridzusatz hervorgerufenen Hemmung der Oxydationsprozesse des Muskels durch einen Laktatzusatz in hohem Grade entgegengearbeitet wird. Die von mir benutzten Fluoridkonzentrationen sind von der gleichen Größen-

ordnung wie jene, die Lipmann in seinen Versuchen verwendet hat (d. h. etwa 0·0005 bis 0·002 Mol).

Im vorstehenden Kapitel ist kurz über die Bedeutung der Monojodessigsäure- und der Monobromessigsäurevergiftung berichtet worden. Ich habe auch selbst einige Versuche mit der letzteren Substanz ausgeführt. In Übereinstimmung mit Meyerhof und Boyland hat sich hierbei gezeigt, daß die Hexosediphosphorsäurespaltung stark gehemmt wird, während die Milchsäureoxydation unbeeinflußt oder ein wenig beschleunigt wird. Es liegt in den hier mitgeteilten Versuchen ein gewisser Unterschied vor, ob man das Co-Enzym im phosphorylierten Zustand verwendet oder nicht. Mit Adenosintriphosphorsäure nach Fiske als Co-Ferment erhält man nämlich eine nicht unwesentliche Hemmung der Milchsäuredehydrierung, während dieser Prozeß vollständig unbeeinflußt verbleibt, wenn man das aus Erbsen dargestellte unphosphorylierte Co-Fermentpräparat verwendet (Versuche 15a und c). Dies ist aber eine Zufälligkeit. Man kann die Extrakte nie ganz frei von Kohlehydrate und Milchsäure erhalten. Wie aus den Tabellen hervorgeht, habe ich nach Zusatz von nur Co-Ferment eine gewisse Reduktion des verwendeten Indikators erhalten. Im vergifteten Extrakt wird diese Reduktion stark gehemmt und es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß sie auf eine Spaltung von im Extrakt entstandene Hexosediphosphorsäure beruht. Da die nach Zusatz von Milchsäure und Co-Ferment erhaltene Oxydation ein Resultant aus dieser Oxydation und der Milchsäureoxydation ist, genügt die Hemmung der Hexosediphosphorsäureoxydation, um hier eine gewisse Hemmung hervorzurufen, die dann mehr oder weniger durch eine Beschleunigung der Milchsäureoxydation kompensiert wird.

Bei den hier veröffentlichten Versuchen ist Monobromessigsäure verwendet worden. Ihre Wirkung scheint jedoch, wie ich durch Kontrollversuche habe bestätigen können, mit der der Monojodessigsäure identisch zu sein.

Es scheint also nicht unwahrscheinlich zu sein, daß die deletäre Wirkung dieser Substanzen auf den Kohlehydratabbau in der von Lohmann zuerst beobachteten Hemmung der Hexosediphosphorsäurespaltung ihre Ursache haben kann. Es zeigt sich auch, daß nach Monobromessigsäurevergiftung eine Synthese von leicht hydrolysierbarem Phosphat aus Hexosediphosphorsäure nicht mehr nachgewiesen werden kann (Versuch 26).

Was die Auffassung von Lundsgaard (5) betrifft, daß man durch diese Vergiftungen den oxydativen von dem anaeroben Kohlehydratabbau zu scheiden imstande sein sollte, halte ich dies für noch ganz unbewiesen und sogar unwahrscheinlich. Die Voraussetzung hierfür wäre, daß es einen Kohlehydratabbau gäbe, der nicht über Phosphor-

säureester passiert. Dies ist aber wenigstens in der Muskelzelle nicht mit Sicherheit nachgewiesen. Die von Lundsgaard gefundene „Atmung" nach Monojodessigsäurevergiftung besteht wohl in einer Oxydation von Milchsäure und anderen Produkten, die mit dem Kohlehydratstoffwechsel vielleicht nichts zu tun haben.

Zusammenfassung.

Es ist früher gezeigt worden (von Euler und Nilsson), daß das System Muskelextrakt–Hexosediphosphorsäure–Co-Zymase die Fähigkeit besitzt, Methylenblau zu reduzieren.

Meine Versuche zeigen, daß die Co-Zymase in diesem System ersetzt werden kann durch Adenosintriphosphorsäure von Fiskes Typus, durch das von Szent-Györgyi dargestellte Co-Ferment für die Milchsäureoxydation, sowie durch ein von mir aus Markkneifelerbsen dargestelltes Präparat. Muskeladenylsäure und Adenosintriphosphorsäure von Lohmanns Typus sind dagegen zusammen mit Hexosediphosphorsäure und Muskelextrakt nicht imstande, im Vakuum eine nennenswerte Mb-Entfärbung hervorzurufen. Die Co-Zymase und die Hexosediphosphorsäure scheinen bei Gegenwart von Muskelextrakt miteinander in der Weise zu reagieren, daß leicht hydrolysierbares Phosphat (Adenosintriphosphorsäure?) entsteht. Mb scheint zuweilen diese Reaktion zu katalysieren.

Die Co-Zymase, die Adenosintriphosphorsäure von Fiskes Typus, sowie Szent-Györgyis Co-Ferment und das von mir aus Erbsen dargestellte Präparat besitzen ferner gemeinsam die Eigenschaft, als Co-Ferment für die Milchsäuredehydrierung in Muskelextrakt auftreten zu können. Auch bei dieser Reaktion sind die Muskeladenylsäure und die laut Lohmann dargestellte Adenosintriphosphorsäure unwirksam. Szent-Györgyis Co-Ferment, sowie das obenerwähnte Erbsenpräparat sind frei von leicht hydrolysierbarem Phosphat. Da sie außerdem Reaktionen geben, die auch Adenylsäuren zukommen (z. B. Pentosereaktion), erscheint es berechtigt, bis auf weiteres anzunehmen, daß diese Präparate Co-Zymase enthalten.

Von Euler hat für die nach Fiske dargestellte Adenosintriphosphorsäure angenommen, daß sie mit Co-Zymase verunreinigt sei.

Meine Beobachtungen lassen sich besser mit der Annahme vereinigen, daß die nach Fiske dargestellte Adenosintriphosphorsäure eine Adenosintriphosphorsäure enthält, die als Adenylsäurekomponente nicht Muskeladenylsäure, wie Lohmanns, sondern Co-Zymase enthält.[1] Von

[1] Vielleicht stehen diese Adenosintriphosphorsäuren in irgendeiner Beziehung zu den von Barrenscheen beobachteten Typen.

dieser Adenosintriphosphorsäure kann man annehmen, daß sie nach Dephosphorylierung in Co-Zymase übergeht, und das eigentliche Co-Ferment für Alkohol- und Milchsäuregärung, sowie Milchsäureoxydation würde demgemäß die Co-Zymase sein.

Die phosphorylierte Co-Zymase (Adenosintriphosphorsäure von Fiskeschem Typus) entsteht wahrscheinlich bei der Spaltung der Hexosediphosphorsäure aus der Co-Zymase und den frei werdenden Phosphorsäureresten, auf Kosten der bei der Hexosespaltung frei werdenden Energie.

Es scheint, als ob die so entstandene Adenosintriphosphorsäure die Co-Fermenteigenschaften der Co-Zymase nicht ganz verloren hätte. So kann sie wahrscheinlich noch als Co-Ferment der Milchsäureoxydation dienen, aber auch bei der Spaltung von Hexosediphosphorsäure kann sie, wie es scheint, mitwirken. Dabei können aber die Phosphorsäurereste der Hexosediphosphorsäure nicht aufgenommen werden, und es entstehen statt Milchsäure oder Brenztraubensäure freie Triosephosphorsäuren, die dann in Glyzerinphosphorsäure und Glyzerinsäurephosphorsäure nach Embdens Theorie umgelagert werden können.

Ich halte es für sehr wahrscheinlich, daß die Muskeladenylsäure und die Lohmannsche Adenosintriphosphorsäure Kunstprodukte sind, die während des Isolierungsverlaufs aus Co-Zymase und aktiver Adenosintriphosphorsäure entstanden sind. Sie scheinen keine direkte Co-Fermentwirkung zu besitzen, aber in Gegenwart von aktivem Co-Ferment entfalten sie eine Wirkung, die leicht als Co-Fermentwirkung gedeutet werden kann. Sie hemmen nämlich die Spaltung der Milchsäure und begünstigen gleichzeitig die Spaltung der Hexosediphosphorsäure, was natürlich zu einer Anreicherung von Milchsäure führen kann.

In Analogie mit der Wirkung von Phosphat, Arsenat und Arsenit wird diese scheinbare Co-Fermentwirkung als eine Verdrängungserscheinung gedeutet, indem ich annehme, daß die Milchsäuredehydrogenase die Co-Zymase an ihren Phosphorsäurerest bindet, und daß die genannten Substanzen mit der Co-Zymase um diese Affinität der Milchsäuredehydrogenase konkurrieren. Die hierdurch frei gewordene Co-Zymase kann dann zum Abbau von Hexosediphosphorsäure verwendet werden.

Betreffs der alten Streitfrage, ob die Hexosediphosphorsäure direkt oder über eine Hexosemonophosphorsäure gespalten wird, geben meine Versuche keinen Anhaltspunkt für die letzte Annahme. Sie sprechen vielmehr dafür, daß Glykogen und Hexosemonophosphorsäure vor der Spaltung unter Mitwirkung von Mg weiter phosphoryliert werden müssen.

Was die Monojodessigsäurevergiftung betrifft, halte ich es für wahrscheinlich, daß ihre hauptsächliche Bedeutung darin besteht, daß sie die Spaltung der Hexosediphosphorsäure verhindert. Dadurch muß nach meiner Auffassung in Muskulatur sowohl der aerobe wie der anaerobe Kohlehydratabbau blockiert werden.

Für die Fluoridvergiftung mache ich die Annahme, daß sie dadurch zu erklären ist, daß, wie Barrenscheen gezeigt hat, die Dephosphorylierung der Adenosintriphosphorsäure verhindert wird.

IV. Über die Oxydation von Milchsäure und Apfelsäure unter dem Einfluß von Muskelextrakt und feinverteilter Muskulatur.

Die intimen Beziehungen zwischen den Enzymen, welche die Oxydation von Milchsäure und Apfelsäure katalysieren, und dem hexosediphosphorsäurespaltenden Enzym brachten es mit sich, daß ich schon im vorigen Kapitel einige Fragen behandelte, welche die Oxydation der Milch- und der Apfelsäure berühren. So ist erwähnt worden, daß Milch- und Apfelsäure durch einen Extrakt aus stark ausgewaschener Muskulatur bei Gegenwart eines Wasserstoffakzeptors dehydriert werden können, daß aber diese Dehydrierung nur nach Zusatz gewisser Substanzen erfolgt, die als Co-Fermente fungieren. Diese Substanzen sind die Co-Zymase, Szent-Györgyis Co-Ferment, das von mir aus Erbsen dargestellte Co-Ferment, sowie die nach Fiske dargestellte Adenosintriphosphorsäure (Versuch 1b, 2, 3, 4). Da es den Anschein hat, als ob Szent-Györgyis Co-Ferment und das von mir dargestellte Co-Ferment sich in allem analog wie die Co-Zymase verhalten, dürfte es, wie früher erwähnt worden ist, berechtigt sein, bis auf weiteres anzunehmen, daß die Wirkung dieser Substanzen darauf beruht, daß die in größeren oder kleineren Mengen Co-Zymase enthalten. Solchenfalls hat man bei diesen Prozessen nur mit einem Co-Fermentsystem zu rechnen, Co-Zymase–Adenosintriphosphorsäure nach Fiske, also ganz wie bei der Hexosediphosphorsäurespaltung. Ein solches System hat offenbar in diesem Zusammenhang nicht die gleiche Berechtigung, als wenn es sich um die Spaltung von Hexosediphosphorsäure handelt. Die Phosphorsäure scheint nämlich für die Oxydation von Milch- und Apfelsäure keine Rolle zu spielen. [Daß Phosphorsäure bei der Milchsäuredehydrierung keine Rolle spielt, geht u. a. daraus hervor, daß eine schnelle Milchsäuredehydrierung durch den Einfluß von Muskelextrakten, die nach Zusatz von gereinigtem Co-Ferment frei von sowohl anorganischem wie leicht hydrolysierbarem Phosphat sind, erhalten werden kann (z. B. Versuch 18).]

Es scheint aber, als ob beide Komponenten im System als Oxydations-Co-Fermente fungieren können (Versuch 3). Dasselbe gilt auch für die Apfelsäuredehydrierung (Versuch 15b und d).

Bei der Ausführung der Versuche, die zu der Auffassung führten, daß die Milch- und die Apfelsäure zu ihrer Oxydation der Co-Zymase bedürfen, führte ich gleichartige Proben mit einer großen Anzahl von organischen Säuren, namentlich Oxysäuren, aus. Unter diesen sollen erwähnt werden: α-Oxybuttersäure, β-Oxybuttersäure, Zitronensäure, Glyzerinsäure, Tartronsäure, Mandelsäure, α-Oxyglutarsäure und Weinsäuren verschiedener Art. Außerdem wurden von Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin untersucht. In den meisten Fällen war die erhaltene Mb-Entfärbung in mit Co-Zymase oder Adenosintriphosphorsäure aktiviertem Muskelextrakt so unbedeutend, daß angenommen werden konnte, daß sie auf geringen Verunreinigungen in den verwendeten Substanzen beruhte. Die einzige Säure, die einen deutlicheren Effekt ergab, ohne jedoch annähernd eine so schnelle Spaltung wie die Milchsäure oder die Apfelsäure zu zeigen, war die Glutaminsäure (Versuch 21). Andersson (2) hat bei Versuchen mit Weizensamen auch eine gewisse Wirkung mit dieser Substanz erhalten. Sie scheint demgemäß ein eingehenderes Studium in dieser Hinsicht zu verdienen. Vielleicht stehen diese Beobachtungen in irgendeinem Zusammenhang mit den von Clark und Mitarbeitern erhaltenen Resultaten, die anzudeuten scheinen, daß der Herzmuskel während seiner Arbeit Aminosäuren oxydiert (siehe z. B. Clark, Gaddie und Stewart).

Andersson (2) glaubt ferner bei Versuchen mit Gurkensamen feststellen zu können, daß Zitronensäure und Äthylalkohol nur bei Gegenwart von Co-Zymase dehydriert werden. Mit Muskelextrakt von dem hier verwendeten Typus kann keine Dehydrierung dieser Substanzen, auch nicht nach Zusatz von Co-Zymase, erhalten werden. Dies kann allerdings darauf beruhen, daß die betreffenden Enzyme nicht vorhanden sind. Ein eigentümliches Zusammentreffen, das vielleicht nicht ganz ohne Bedeutung ist, verdient hier hervorgehoben zu werden. Sämtliche Samen, die Zitronensäure dehydrieren, greifen auch Glykogen an. Da der Glykogenabbau wahrscheinlich über phosphorylierte Hexosemoleküle verläuft, müssen also diese Samen aktive Phosphatasen erhalten.

Der von mir verwendete Muskelextrakt enthält, wie früher gesagt worden ist, kaum Phosphatasen.

Ich habe es eigentümlich gefunden, daß man in mit Co-Zymase aktivierten Muskelextrakten keine Dehydrierung der mit Milchsäure nahe verwandten α-Oxybuttersäure erhalten konnte, da die zweibasische Apfelsäure leicht angegriffen wurde. Einige Versuche mit fein zer-

schnittener, stark ausgewaschener Froschmuskulatur haben Resultate geliefert, die vielleicht zu der Lösung dieses Rätsels führen können. Es zeigt sich nämlich, daß die fein zerschnittene Muskulatur die Fähigkeit behält, Apfelsäure zu dehydrieren, trotzdem sie durch Auswaschen das Vermögen verloren hat, Milchsäure anzugreifen. Die Milchsäuredehydrogenase ist jedoch noch vorhanden, denn nach Zusatz von Co-Ferment kehrt das Vermögen, Milchsäure zu dehydrieren, zurück (Versuch 20). Dies kann vielleicht so gedeutet werden, daß es zwei Formen von Apfelsäureoxydation gibt, eine, bei der Co-Zymase erforderlich ist, und eine andere, die ohne Co-Zymase stattfindet. Ist dies der Fall, so kann man annehmen, daß die Form der Abbaues, zu der die Co-Zymase notwendig ist, durch eine Decarboxylierung der Apfelsäure zu Milchsäure eingeleitet wird. Unter solchen Umständen würde die Wirkung der Co-Zymase bei der Oxydation von Milchsäure und Apfelsäure identisch sein können. Die Oxydation der Apfelsäure ohne Mitwirkung von Co-Zymase könnte vielleicht eine direkte Dehydrierung der Apfelsäure zu Oxalessigsäure sein. Auf das Vorkommen einer derartigen Reaktion haben Hahn und Haarmann (1, 2), sowie Hahn, Haarmann und Fischbach (1) aus Versuchen mit Muskelbrei geschlossen. Sicher ist, daß die Oxydation der Apfelsäure in Gegenwart von Co-Zymase mit der Milchsäuredehydrierung sehr nahe verwandt sein muß, denn sie wird in gleicher Weise wie diese von Arsenat, Arsenit, Fluorid und Monobromacetat beeinflußt (Versuch 9, 10, 13, 15b, 15d).

Ein sehr auffallender Unterschied zwischen der Oxydation von Milchsäure und Apfelsäure liegt in ihrem Verhalten zu Redoxindikatoren mit verschiedenem Normalpotential. Während die Milchsäure immer imstande ist, eine vollkommene Entfärbung, sogar eines so negativen Indikators wie Indigodisulfonat, hervorzurufen (d. h. wenn die Konzentrationsverhältnisse nicht zu ungünstig liegen), kann die Apfelsäure bisweilen nicht einmal eine vollkommene Entfärbung von Methylenblau herbeiführen. Dies dürfte, wie ich früher einmal hervorgehoben habe, Holmberg (2), auf folgende Weise erklärt werden können: Ein Muskelextrakt von diesem Typus enthält außer den von mir untersuchten Oxydationsenzymen in wechselnden Mengen zwei weitere Enzyme, die für den Apfelsäureumsatz von Bedeutung sind, nämlich Succinodehydrogenase und Fumarase. Die Fumarase greift Apfelsäure an und verwandelt sie durch Wasserabspaltung in Fumarsäure. Die Succinodehydrogenase katalysiert die reversible Reaktion Bernsteinsäure–Fumarsäure. Diese letztere Reaktion hat ein Redoxpotential, das sehr nahe dem des Systems Mb–Leuko-Mb liegt. Wenn nun aus der zugesetzten Apfelsäure durch die Wirkung der Fumarase beständig neue Mengen von Fumarsäure gebildet werden, tritt leicht ein Gleichgewicht zwischen den drei Oxydo-

reduktionssystemen ein, was zum Resultat hat, daß die Dehydrierung der Apfelsäure (direkt oder indirekt) zu keiner entsprechenden Mb-Entfärbung führt. Der Effekt wird natürlich noch deutlicher, wenn man einen Redoxindikator mit mehr negativem Normalpotential als Mb verwendet. Wählt man dagegen einen Redoxindikator, dessen Normalpotential hinlänglich stark positiv ist, kann der Effekt eliminiert werden und es tritt eine vollständige Entfärbung ein. In der Praxis zeigt es sich, daß Thionin mit Vorteil verwendet werden kann, trotzdem es ein Normalpotential hat, welches das des Mb nur unbedeutend übersteigt.

Zu allen Versuchen mit Apfelsäure, sowie zu allen Versuchen mit Milchsäure und Hexosediphosphorsäure, in denen auf einen Vergleich mit Apfelsäure abgezielt wurde, habe ich daher anstatt Mb Thionin als Akzeptor verwendet. Die hier gegebene Theorie, daß die verschiedenen Oxydationsverhältnisse der Apfel- und der Milchsäure ein sekundäres Phänomen sei, wird dadurch gestützt, daß es oft gelingt, Muskelextrakte herzustellen, die auch mit Apfelsäure sogar Indigodisulfonat zu entfärben imstande sind.

Bei der Oxydation von Milchsäure sollte unter den von mir verwendeten Versuchsbedingungen eine Bildung von Brenztraubensäure zu erwarten sein. Da die Brenztraubensäuremenge, die nach der Entfärbung einer Mb-Lösung von $^1/_{1000}$ (Totalkonzentration etwa $^1/_{4000}$) entsteht, so gering ist, daß sie nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden kann, und da stärkere Lösungen von Mb auf den Muskelextrakt zersetzend einwirken, habe ich versucht, größere Mengen von Brenztraubensäure zu erhalten, indem ich einen mit Mb versetzten Muskelextrakt, der Co-Zymase und Milchsäure enthielt, bei vollem Luftzutritt stehen ließ. Hierbei zeigte sich indessen, daß der zu Beginn intensive Oxydationsprozeß bald zum Stillstand kommt. Wenn man nach ein paar Minuten 1 ccm dieser Mischung in ein Thunbergrohr abpipettiert und evakuiert, so erhält man keine Entfärbung. Diese Hemmung der Oxydation bei Gegenwart von Sauerstoff kann durch Zusatz von Katalase in gewissem Maße verhindert werden und dürfte also zum Teil eine Vergiftung durch Wasserstoffsuperoxyd darstellen. Ein Zusatz von Katalase genügt aber nicht, um den Oxydationsprozeß längere Zeit aufrecht zu erhalten, es scheint noch ein Faktor unbekannter Art mitzuwirken (vielleicht eine Zerstörung oder ein Blockieren der Dehydrogenase durch gebildete Brenztraubensäure?), und es ist mir nicht gelungen, auf diesem Wege eine sichere Zunahme des Brenztraubensäuregehaltes in Muskelextrakt nach Dehydrierung der Milchsäure nachzuweisen. Meine Resultate stimmen mit denjenigen von Case und Cook, die auch nicht imstande waren, eine Zunahme von Brenztraubensäure in Muskelextrakt nach Milchsäurezusatz nachzuweisen.

Schließlich habe ich einige Versuche über die Oxydation der verschiedenen optisch aktiven Apfelsäuren ausgeführt. Thunberg (5) hat gezeigt, daß feingehackte Froschmuskulatur nur l-Apfelsäure anzugreifen imstande ist. Da der Oxydationsmechanismus, wie früher gesagt wurde, im Muskelextrakt vielleicht ein anderer ist, war es von Interesse zu sehen, wie die Verhältnisse hier liegen würden. Es zeigte sich, daß auch hier nur die l-Form angegriffen wurde. Die d-Form ist vollkommen stabil. Ihre Anwesenheit stört auch nicht die Oxydation der l-Apfelsäure (Versuch 16, 17). Da die l-Apfelsäure mit der d-Milchsäure übereinstimmt, lassen sich diese Resultate gut mit denjenigen von Meyerhof vereinigen, nach denen nur die d-Milchsäure von der Muskelzelle oxydiert wird (siehe z. B. Meyerhof und Boyland).

Zusammenfassung.

Extrakte von stark ausgewaschener Muskulatur erhalten durch Zusatz von Co-Zymase oder Fiskes Adenosintriphosphorsäure das Vermögen, bei Gegenwart eines geeigneten Wasserstoffakzeptors Milchsäure und Apfelsäure zu oxydieren. In bezug auf die Apfelsäure bestehen gewisse Gründe für die Vermutung, daß die Oxydation erst stattfindet, nachdem sie zu Milchsäure decarboxyliert worden ist.

Von einer großen Anzahl untersuchter organischer Säuren hat außer den früher genannten nur die Glutaminsäure unter ähnlichen Verhältnissen eine Mb-Entfärbung herbeiführen können. Von den optisch aktiven Apfelsäuren kann nur die l-Form von den von mir verwendeten Muskelextrakten gespaltet werden, was in guter Übereinstimmung mit dem früher für Milchsäure gefundenen steht. Der Nachweis von Brenztraubensäurebildung nach der Dehydrierung von Milchsäure ist nicht gelungen, denn die Dehydrierung kommt bei Anwesenheit von Sauerstoff sehr bald zum Stillstand.

Nach der in den letzten Kapiteln vertretenen Auffassung ist also die Co-Zymase als Co-Ferment für alle Formen von Kohlehydratspaltung, die über Moleküle mit 3-Kohlenstoffketten verlaufen, anzusehen.

Ihre Funktion ist dabei eine zweifache. Erstens bewirkt sie wahrscheinlich eine Oxydation von gewissen Alkoholgruppen zu Keto- oder Aldehydgruppen, zweitens vermag sie die Phosphorsäurereste der Hexosediphosphorsäure bei ihrer Spaltung zu übernehmen und fungiert dadurch als eine Art Energiespeicher.

Auch bei der Oxydation gewisser nichtphosphorylierter Verbindungen kommt die erste Funktion der Co-Zymase zur Geltung.

V. Experimentelles.

Die Thunbergtechnik.

In dieser Arbeit ist die Methylenblaumethode in der Form verwendet worden, wie sie von Thunberg (3) in Oppenheimer-Pincussen, „Die Fermente und ihre Wirkungen", beschrieben worden ist. Dort findet man alle Angaben hinsichtlich der benutzten Vakuumröhren, Wasserthermostat, Evakuierungstechnik usw.

Die Temperatur im Wasserthermostat hat in sämtlichen Versuchen 37° betragen.

In einigen Fällen sind andere Redoxindikatoren als Mb zur Verwendung gelangt, dies hat aber auf die Technik im übrigen keinen Einfluß gehabt. Das verwendete Mb-Präparat ist Mercks „Methylenblau medicinale". Die anderen Indikatoren sind Fabrikate der „British Drug Houses" gewesen.

In gewissen Fällen sind Phosphatpuffer von wechselndem p_H zugesetzt worden. Da nicht beabsichtigt gewesen ist eine exakt eingestellte Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen, sondern nur größere Verschiebungen im Laufe der Versuche zu verhindern, sind die verwendeten Puffer zwar mit größtmöglicher Genauigkeit zubereitet, aber keiner elektromotorischen Kontrollmessung unterworfen worden. Für die p_H-Kurve der Methylglyoxaldehydrierung habe ich jedoch elektrometrisch kontrollierte Puffermischungen verwendet.

In einigen Versuchen, wo aus dem einen oder anderen Grunde kein Phosphat gegenwärtig gewesen sein dürfte und wo die Pufferung daher besonders schlecht gewesen ist, sind sämtliche verwendeten Lösungen mit Hilfe eines geeigneten Indikators so genau wie möglich auf das p_H des benutzten Muskelextraktes neutralisiert worden. Wenn diese Vorsichtsmaßregeln eingehalten wurden, waren die Resultate auch unter solchen Bedingungen regelmäßig und leicht reproduzierbar.

Die Wasserstoffionenkonzentration im Versuchsmilieu ist im allgemeinen etwas auf der alkalischen Seite von p_H 7 gehalten worden. Wird die Reaktion sauer (p_H nähert sich 6), so kann es leicht zu einer Ausfällung von Eiweißstoffen im Muskelextrakt mit darauffolgender Herabsetzung der Fermentwirkung kommen. Die Reaktion darf aber auch nicht zu weit auf der alkalischen Seite liegen (p_H gegen 8), da dies eine schnelle Fermentzerstörung verursacht.

Bei der Beschreibung der Mb-Versuche ist das Material in Tabellenform zusammengestellt worden, wobei jede vertikale Kolumne ein Vakuumrohr repräsentiert. Ganz unten in der Tabelle stehen die Entfärbungszeiten.

Bestimmung von organischem und anorganischem Phosphat.

A. Bestimmung von freiem anorganischem Phosphat.

Bei sämtlichen Phosphatbestimmungen ist Briggs (1) Methode zur Verwendung gelangt. Die für diese Methode erforderlichen Reagenzien sind:

1. 5 Proz. Ammoniummolybdat.
2. 20 Proz. Natriumsulfit.
3. $^1/_2$ Proz. Hydrochinonlösung. Diese Lösung wird mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure per 100 ccm versetzt.
4. Schwefelsäure: 300 ccm konzentrierte Schwefelsäure werden mit Aqua dest. auf 1000 ccm verdünnt.
5. Standardphosphatlösung: 0,4394 g Kaliumphosphat laut Sörensen in 1000 ccm Aqua dest. (enthält 0·1 mg P per ccm).

Zur Ausführung der Analyse sind eine Serie von Meßkolben von 10 ccm, sowie ein gutes Kolorimeter erforderlich. Die eiweißhaltige Probe wird mit Trichloressigsäure gefällt und filtriert. 1 ccm des Filtrates wird in einen Meßkolben abpipettiert und mit folgenden Reagenzien versetzt: 1 ccm Schwefelsäure, 2 ccm Ammoniummolybdat, 1 ccm Natriumsulfit, 1 ccm Hydrochinon und Wasser auf 10 ccm. 1 ccm Standardphosphatlösung wird in gleicher Weise behandelt. Die beiden Kolben werden 25 Minuten stehen gelassen, worauf die Intensität der Farben im Kolorimeter verglichen wird. Wenn die Probe mehr Phosphorsäure als die Standardlösung enthält, wird sie vor der definitiven Analyse verdünnt, so daß ihr Phosphorsäuregehalt so nahe wie möglich mit dem der Standardlösung übereinstimmt. Ist der Phosphorsäuregehalt sehr gering, so nimmt man mehr von der Probe, bis zu 5 ccm. Eventuell kann der Standard verdünnt werden.

B. Bestimmung des totalen säurelöslichen Phosphates.

Zu diesen Analysen werden die gleichen Reagenzien verwendet wie zur Bestimmung von freiem Phosphat. Außerdem kommt phosphatfreies Perhydrol hinzu.

5 ccm des entsprechend verdünnten Trichloressigsäurefiltrates werden mit 5 ccm der unter A. beschriebenen Schwefelsäure in einem Kjeldahlkolben gekocht, bis Schwefelsäuredämpfe aufzutreten beginnen. Die Flüssigkeit läßt man erkalten und versetzt sie mit einem Tropfen Perhydrol. Dann wird abermals erwärmt, bis die Flüssigkeit klar und farblos geworden ist. Nach dem Erkalten des Inhaltes im Kjeldahlkolben wird er quantitativ in einen 25-ccm-Meßkolben gebracht, der dann mit Wasser aufgefüllt wird. Nachdem die Mischung im Meßkolben vollständig ge-

worden ist, werden 5 ccm herausgenommen und in einen der 10-ccm-Kolben für die Phosphatanalyse gebracht. Hier werden 2 ccm Ammoniummolybdat, 1 ccm Natriumsulfit und 1 ccm Hydrochinon zugesetzt und mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Dann wird in üblicher Weise mit einer Standardprobe verglichen.

C. Bestimmung von leicht säurehydrolysierbarem Phosphat.

Zur Bestimmung von leicht säurehydrolysierbarem Phosphat (Adenosintriphosphorsäure) habe ich Jacobsens (1) Modifikation von Lohmanns Methode verwendet. Die verwendeten Reagenzien sind dieselben wie bei der Bestimmung von anorganischem Phosphat nach Briggs.

1 ccm — oder mehr — des Trichloressigsäurefiltrates der Probe wird in einem 10-ccm-Meßkolben mit 1 ccm der für die Phosphatbestimmung zubereiteten Schwefelsäure, sowie Wasser bis zu 6 ccm versetzt. Es wird 15 Minuten im Wasserbade gekocht. Nach schnellem Abkühlen werden 2 ccm Ammoniummolybdat, 1 ccm Natriumsulfit, 1 ccm Hydrochinon, sowie Wasser bis zu 10 ccm zugesetzt. Dann wird in gewöhnlicher Weise gegen Standard kolorimetriert. In dieser Weise werden die zwei leicht hydrolysierbaren Phosphorsäurereste in der Adenosintriphosphorsäure bestimmt. Die Methode ist einfacher als Lohmanns ursprüngliche, bei der man mit 2n-HCl hydrolysierte, mit Lauge neutralisierte und dann die Phosphatbestimmung ausführte. Der einzige Nachteil scheint in der etwas längeren Hydrolysezeit zu liegen (7 Minuten mit Lohmanns Methode).

Für den Fall, daß gleichzeitig andere, schwerer hydrolysierbare Ester (besonders Hexosediphosphorsäure) vorhanden sind, hat Lohmann für die mit seiner Methode erhaltenen Werte einen Korrektionsfaktor eingeführt, dessen Größe aus dem Phosphorwert berechnet werden kann, den er nach 30 Minuten Hydrolyse erhält. Jacobsen hat für seine Methode keinen ähnlichen Faktor berechnet, für die von mir ausgeführten Versuche ist dies jedoch ohne Bedeutung gewesen.

D. Die Aufnahme von Hydrolysekurven zur Beurteilung der Frage, ob ein bekannter Phosphorsäureester enzymatische Veränderungen erleidet.

Lohmann (1, 2) hat gezeigt, daß man Hexosediphosphorsäure von Robisons Ester unterscheiden kann, indem man die Geschwindigkeit ermittelt, mit der sie anorganisches Phosphat bei Säurehydrolyse abspaltet. Die Methode ist später von Lipmann und Lohmann verwendet worden, um zu zeigen, daß die Hexosediphosphorsäure unter gewissen Verhältnissen von Muskelextrakt in einen schwerer hydrolysierbaren Ester umgewandelt werden kann. Bei diesen Versuchen haben

sie im Wasserbade mit n-Salzsäure gekocht. Dreistündiges Kochen spaltet die Hexosediphosphorsäure zu (Harden-Youngs Säure) 95 Proz.

Bei einigen Versuchen zur Klarlegung der Frage, ob Hexosediphosphorsäure in Gegenwart von Co-Zymase in schwer hydrolysierbare Ester umgewandelt wird, habe ich eine Modifikation von Lohmanns Methode verwendet, die der von Jacobsen zur Bestimmung von leicht hydrolysierbarem Phosphat angegebenen vollkommen analog ist. Ich habe also anstatt in n-Salzsäure zu hydrolysieren, die zur Phosphatbestimmung verwendete Schwefelsäure verwendet. Die Mischung ist dieselbe gewesen wie bei der Hydrolyse von leicht hydrolysierbarem Phosphat. Die verwendeten Hydrolysezeiten betrugen 15 Minuten, 30 Minuten, $1^1/_2$ Stunde und 3 Stunden. Nach 3 Stunden waren mit dieser Methode 72 Proz. der Hexosediphosphorsäure gespalten (Mittelwert aus 3 Bestimmungen, die mit einem Präparat von hexosediphosphorsaurem Magnesium aus Neubergs Laboratorium ausgeführt worden sind).

Darstellung von Muskelextrakt.

A. Das Rohmaterial.

Die Muskelextrakte sind im allgemeinen aus Pferdefleisch dargestellt worden, das beim Fleischer eingekauft wurde. „Dunkles" Fleisch scheint das beste Material zu liefern. Das Fleisch soll nicht „gehangen" haben, aber auch nicht ganz neugeschlachten sein. Die besten Extrakte werden in der Regel mit Fleisch erhalten, das 1 bis 2 Tage nach dem Schlachten gelegen hat.

In einigen Fällen sind Extrakte aus der Brustmuskulatur von Tauben zubereitet worden. Dieses Fleisch kann mit Vorteil gleich nach dem Schlachten verwendet werden und die auf diese Weise erhaltenen Extrakte bilden daher eine gute Kontrolle dafür, daß man es nicht mit Bakterienwirkung zu tun hat.

B. Die Feinverteilung.

Vor der Extraktion wird das Fleisch von Fett und Sehnen befreit und dreimal in einer gewöhnlichen Fleischmaschine gemahlen.

C. Das Auswaschen.

Sämtliche Versuche sind mit Muskulatur ausgeführt, die vor der Extraktion gründlich ausgewaschen worden ist, um Co-Ferment und Donatorsubstanzen (Milchsäure, Hexosediphosphorsäure usw.) so gründlich wie möglich zu entfernen.

Es ist unmöglich, eine exakte Regel dafür anzugeben, wie man beim Auswaschen zu verfahren hat, da das Rohmaterial allzu große Variationen aufweist. Als Waschflüssigkeit habe ich teils gewöhnliches destilliertes

Wasser, teils $^1/_2$ Proz. Kochsalzlösung verwendet. Die Kochsalzlösung hat den Vorteil, daß man praktisch farblose Extrakte bekommt. Die nach Kochsalzwaschung erhaltenen Extrakte scheinen indessen nicht ganz so haltbar zu sein wie die nach Auswaschen mit nur Wasser erhaltenen.

Das Auswaschen erfolgt in der Weise, daß die gemahlene Muskulatur in eine Porzellanreibschale gelegt wird, auf deren Grund sich ein Stück Gaze befindet. Sie wird hierauf mit dem Dreifachen ihres Gewichtes an Waschflüssigkeit ausgerieben und dann ungefähr 5 Minuten damit extrahiert. Darauf wird die Flüssigkeit in der Gaze sorgfältig ausgepreßt und die Prozedur mit der gleichen Quantität neuer Waschflüssigkeit wiederholt. Es ist, wie gesagt, unmöglich anzugeben, wie oft man in dieser Weise waschen muß, um die Muskulatur von Co-Ferment und Donatorsubstanzen zu befreien. Man nimmt daher nach 4 bis 5 Waschungen zweckmäßig eine Probeextraktion vor. Die Muskelmasse wird statt mit Wasser mit einer entsprechenden Menge 0·87prozentiger Dikaliumphosphatlösung ausgerührt und bei Zimmertemperatur 15 Minuten extrahiert. Darauf wird zentrifugiert und der so erhaltene Extrakt in einem Thunbergversuch geprüft, der zweckentsprechend in folgender Weise angeordnet wird. (Hier wird vorausgesetzt, daß es sich um die Prüfung eines Extraktes handelt, der zum Arbeiten mit der Milchsäuredehydrogenase verwendet werden soll; wenn der Extrakt mit Hexosediphosphorsäure zur Verwendung gelangen soll, muß eine $^1/_{1000}$-Lösung eines Salzes der Hexosediphosphorsäure die Milchsäure in der Probe ersetzen.)

Mb $^1/_{5000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Muskelextrakt.	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Fermentlösung	—	0·1	—	0·1	„
Kaliumlaktat $^1/_{100}$	—	—	0·2	0·2	„
Aqua dest.	0·3	0·2	0·1	—	„
Entfärbungszeiten.					

Ist die Auswaschung gut gelungen und das verwendete Co-Fermentpräparat von guter Beschaffenheit, so sollen die drei ersten Röhren nach 1 bis 2 Stunden noch nicht entfärbt sein, während das vierte Rohr keine längere Entfärbungszeit als etwa 15 bis 20 Minuten haben soll. Sollte sich herausstellen, daß die Auswaschung ungenügend gewesen ist (Rohr 2 und 3 werden zu schnell entfärbt), so wäscht man die übrige Muskelmasse noch zweimal mit dest. Wasser und extrahiert dann abermals mit Phosphatlösung. Eventuell kann die Prozedur noch einmal wiederholt werden. Man hat darauf zu achten, daß die Muskelmasse nicht zu lange mit der Phosphatlösung in Berührung steht, bevor mit der neuen Auswaschung begonnen wird, da dies einen ungünstigen Einfluß auf die Aktivität des Fermentes hat.

D. Die Extraktion.

Diese Prozedur ist zum größten Teil im Bericht über die Darstellung eines Probeextraktes beschrieben worden. In einigen Fällen, in denen es wünschenswert gewesen ist, daß der Extrakt kein anorganisches Phosphat enthalte, bin ich in folgender Weise vorgegangen: Die ausgewaschene Muskelmasse wird mit dem Dreifachen ihres Gewichtes dest. Wassers ausgerührt, worauf ein paar Tropfen einer konz. Kaliumkarbonatlösung zugesetzt werden, so daß die Reaktion schwach alkalisch wird (nicht über p_H 8). Nachdem die Muskelmasse 15 Minuten bei Zimmertemperatur gestanden hat, wird sie unter starkem Umrühren vorsichtig bis zu neutraler Reaktion mit verdünnter Salzsäure versetzt. Während der Extraktion mit der Kaliumkarbonatlösung schwillt die Muskelmasse kräftig an. Die Neutralisation mit Säure verursacht allerdings eine gewisse Abschwellung, aber in den meisten Fällen genügt die Zentrifugierung doch nicht, um eine größere Menge Extrakt zu erhalten. Man verfährt daher am besten so, daß man zuerst mit der Gaze auspreßt und dann die ausgepreßte Flüssigkeit zentrifugiert. Schließlich wird das p_H im Extrakt stabilisiert, indem man die Kohlensäure durch Absaugen vertreibt und dann abermals mit HCl neutralisiert.

Bei der Darstellung von Phosphatextrakt aus Taubenmuskulatur kann das Verfahren zweckmäßig dahin vereinfacht werden, daß man anstatt auszupressen nach jedem Waschen nur eine einfache Auswaschung auf der Zentrifuge durchführt. Hierbei ist es zweckmäßig, etwa das Fünffache des Gewichtes der Muskelmasse an Waschwasser zu verwenden. Nach 5 Waschungen pflegt das Co-Ferment verschwunden zu sein, aber die Donatorsubstanzen sind schwieriger ganz zu entfernen.

Von Tauben habe ich stets nur die Brustmuskulatur verwendet.

Die mit 0,87prozentiger Dikaliumphosphatlösung erhaltenen Extrakte werden im folgenden als Phosphatextrakte bezeichnet, die mit Kaliumkarbonatlösung dargestellten als Karbonatextrakte.

Die Phosphatextrakte sind bei Aufbewahrung im Eisschrank mehrere Tage haltbar. Wünscht man sich vor Bakterienwachstum zu sichern, so kann man den Extrakt im Verwahrungsgefäß mit Toluol überschichten, was die Enzymaktivität nicht nennenswert beeinträchtigt.

Did Karbonatextrakte sind nicht so haltbar, können aber im allgemeinen innerhalb 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

Die Feinverteilung und Waschung von Froschmuskulatur.

Das Material besteht aus der Muskulatur der Hinterbeine von 1 bis 2 Fröschen. Diese wird mit einer Schere 5 Minuten lang auf einer Glasscheibe zerschnitten, bis die Muskulatur einer zähen, zusammenklebenden

Masse gleicht. Die so erhaltene Muskelmasse wird gewogen und in einen großen Kolben gebracht, wo sie mit etwa dem Hundertfachen ihres Gewichtes an dest. Wasser übergossen wird. Unter beständigem Umschütteln wird nun etwa 15 Minuten extrahiert, darauf wird das Wasser vorsichtig durch einen Trichter abgegossen, über dessen Ränder ein Stück Gaze gespannt ist, das die Muskulatur auffängt. Nach dem Auspressen des meisten Wassers mit der Gaze wird die Muskelmasse in eine Latapiemühle gelegt, deren Kolben fest eingeschraubt wird. In dieser Weise wird der größte Teil des noch vorhandenen Wassers ausgepreßt. Die fast vollständig trockene Muskelmasse wird abermals in der früher beschriebenen Weise mit der hundertfachen Menge Wasser gewaschen und schließlich wird das Waschen ein drittes Mal nach einfachem Auspressen in der Gaze wiederholt. Zuletzt wird die Muskelmasse wiederum mit der Gaze ausgepreßt und während des Versuches auf einem eisgekühlten Uhrglas aufbewahrt. In bezug auf das Abwiegen der Muskelmasse, ihr Einführen in die Vakuumröhren usw. siehe Thunberg (3). Bei Versuchen mit ausgewaschener Froschmuskulatur wurde ein Phosphatpuffer von folgender, von Thunberg angegebenen Zusammensetzung verwendet: 6·6 g K_2HPO_4 + 16 g KH_2PO_4 gelöst in 100 ccm Wasser.

Beschreibung der am meisten verwendeten Präparate.

1. Co-Zymase.

Von der gereinigten Co-Zymase sind zwei Präparate zur Verwendung gelangt: „Co-Zymase 1" enthält 150 Co-Einheiten per ccm. A. Co. = 50000, Trockengewicht 3 mg per ccm. „Co-Zymase 2" enthält 180 Co-Einheiten per ccm. A.Co. = 20000 Trockengewicht 9·5 mg per ccm. Die Präparate werden in wäßriger Verdünnung verwendet.

2. Adenosintriphosphorsäure nach Fiske.

Ein Präparat, das von Deuticke in Embdens Laboratorium nach Fiskes Vorschriften dargestellt worden ist. Reinheitsgrad: Nach Angaben von Deuticke stimmt der Quotient P/N gut mit dem Theoretischen überein. Nach eigener Untersuchung beträgt der Quotient leicht hydrolysierbares Phosphat/Totalphosphat 2/3·1. Das Präparat ist ein Ca-Salz und wird in wäßriger Lösung verwendet.

3. Adenosintriphosphorsäure nach Lohmann.

Ein Präparat, das von mir in Professor Eges Laboratorium dargestellt worden ist. Reinheitsgrad: Der Quotient leicht hydrolisierbares Phosphat/Totalphosphat beträgt 2/2·9. Das Präparat ist ein Ba-Salz. Es wird in Salzsäure gelöst und mit Sulfat gefällt, worauf die Lösung mit Kalilauge neutralisiert und filtriert wird.

4. Muskeladenylsäure.

Ein Präparat aus Embdens Laboratorium. Es wird in wäßriger Lösung neutralisiert mit schwacher Kalilauge verwendet.

5. Milchsäure.

Kaliumlaktat von Kahlbaum und Lithiumlaktat von B.D.H.

6. Apfelsäure.

Die meisten Versuche sind mit l-Apfelsäure von Kahlbaum ausgeführt worden. Die Aktivität der optischen Isomeren ist mit reinen Präparaten von Professor B. Holmberg in Stockholm untersucht worden.

7. Hexosediphosphorsäure.

Folgende Präparate sind zur Verwendung gelangt: Hexosediphosphorsaures Magnesium aus Neubergs Laboratorium; Candiolin von Bayer, ein Präparat, das Deuticke analysiert und als für enzymatische Zwecke hinreichend rein gefunden hat; hexosediphosphorsaures Kalium, das aus „Glukofose" von Astra durch Umsetzung mit Kaliumoxalat dargestellt worden ist. Das Magnesium und das Kaliumsalz werden in wäßriger Lösung verwendet. Candiolin wird in n/200 HCl gelöst. Da die verwendeten Candiolinlösungen nie stärker als $^1/_{1000}$ gewesen sind, ist es möglich gewesen, sie mit Kalilauge zu neutralisieren, ohne daß ein Niederschlag entsteht.

8. Robisons Ester.

Ein Präparat aus von Eulers Laboratorium.

9. Glutaminsäure.

Ein Präparat von Kahlbaum. Es sind Kontrollversuche mit einem anderen Präparat von Schuckhardt ausgeführt worden.

10. Szent-Györgyis Atmungs-Co-Ferment.

Ein Präparat, das aus Szent-Györgyis Laboratorium erhalten worden ist. Das Präparat löst sich langsam in Wasser: die Lösung zeigt schwach saure Reaktion. Es wird in neutralisierter wäßriger Lösung verwendet.

11. Co-Ferment aus Erbsen.

Siehe Holmberg (2). Das Präparat ist in der Regel nicht vollständig von Alkohol befreit worden, da der Alkohol die Dehydrierungsprozesse in Extrakten aus ausgewaschener Muskulatur nicht beeinflußt.

12. Glykogen.

Ein Präparat von Kahlbaum.

Versuch 1.

Ad.L. = adenosintriphosphorsaures Ba nach Lohmann. Die Lösung, die wie vorher beschrieben zubereitet ist, enthält die Ad.L. in einer Konzentration von $^1/_{500}$, als Ba-Salz berechnet.

a)

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (1) $^1/_{10}$	—	0·2	—	—	—	0·2	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	0·2	—	—	0·2	0·2	0·2	„
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	—	—	—	0·4	—	—	0·4	—	„
Ad. L. $^1/_{500}$	—	—	—	—	0·2	—	—	0.2	„
Aqua dest.	0·6	0·4	0·4	0·2	0·4	0·2	—	0·2	„
Entfärbungszeiten	—	—	—	—	—	4	—	75	Min.

b)

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (1) $^1/_{10}$	—	—	0·2	0·2	—	—	—	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·2	—	0·2	—	0·2	—	0·2	—	„
Kaliummalat (1) $^1/_{100}$	—	0·2	—	0·2	—	0·2	—	0·2	„
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	—	—	—	—	0·4	0·4	—	—	„
Ad. L. $^1/_{500}$	—	—	—	—	—	—	0·2	0·2	„
Aqua dest.	0·4	0·4	0·2	0·2	—	—	0·2	0·2	„
Entfärbungszeiten	—	—	2	4	—	—	—	—	Min.

a) und b) sind mit demselben Muskelextrakt ausgeführt. Versuchszeit: 2 Stunden.

Versuch 2.

Co S.G. = Co-Ferment nach Szent-Györgyi.

Thionin $^1/_{15000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co S. G. $^1/_{2000}$	—	0·2	—	—	—	0·2	0·2	0·2	„
Kaliumlactat (dl) $^1/_{100}$	—	—	0·5	—	—	0·5	—	—	„
Kaliummalat (1) $^1/_{200}$	—	—	—	0·5	—	—	0·5	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	0·5	—	—	0·5	„
Aqua dest.	1·0	0·8	0·5	0·5	0·5	0·3	0·3	0·3	„
Entfärbungszeiten	—	—	—	—	—	18	10	14	Min.

Versuchszeit: 2 Stunden.

Versuch 3.

Ad.F. = adenosintriphosphorsaures Ca nach Fiske.

Thionin $^1/_{15000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	—	0·3	—	—	—	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	0·5	—	—	0·5	—	—	„
Kaliummalat (1) $^1/_{200}$	—	—	—	0·5	—	—	0·5	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	0·5	—	—	0·5	„
Aqua dest.	1·3	1·0	0·8	0·8	0·8	0·5	0·5	0·5	„
Entfärbungszeiten	—	—	—	—	—	12	13	2	Min.

Versuchszeit: 2 Stunden.

Versuch 4.

Co E. = Co-Ferment aus Erbsen.

Thionin $^1/_{15000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	—	0·3	—	—	—	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	0·5	—	—	0·5	—	—	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	—	—	—	0·5	—	—	0·5	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	0·5	—	—	0·5	„
Aqua dest.	1·3	1·0	0·8	0·8	0·8	0·5	0·5	0·5	„
Entfärbungszeiten	—	—	—	—	—	15	12	12	Min.

Versuchszeit: 2 Stunden.

Versuch 5.

a)

Mb $^1/_{30000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (1) $^1/_{10}$	—	0·1	0·1	0·1	0·1	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	0·2	0·2	—	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	—	0·2	0·2	„
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	—	—	0·4	—	0·4	„
Aqua dest.	0·7	0·4	—	0·4	—	„
Entfärbungszeiten	—	10	6	2·5	5	Min.

b)

Mb $^1/_{5000}$	0·5	0·5	0·5	0 5	ccm
Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co S. G. $^1/_{4000}$	0·1	0·1	0·1	0·1	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·2	0·2	—	—	„
Hexosediphosphorsaures Mg $^1/_{1000}$	—	—	0·2	0·2	„
Ad. L. $^1/_{500}$	—	0·2	—	0·2	„
Aqua dest.	0·2	—	0·2	—	„
Entfärbungszeiten	5	9	14	4	Min.

c)

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·2	—	0·2	—	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	—	0·2	—	0·2	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	0·1	0·1	0·1	0·1	„
Ad. L. $^1/_{500}$	—	—	0·3	0·3	„
Aqua dest.	0·3	0·3	—	—	„
Entfärbungszeiten	6	18	11	23	Min.

Versuch 6.

Mb $^1/_{30000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (1)	—	—	—	—	0·1	0·1	0·1	0·1	—	—	0·1		„
Co-Zymase (1) $^1/_{10}$	—	0·1	0·1	0·1	—	—	—	—	—	—	—		„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	0·1	—	0·1	0·1	—	—	0·1	—	—		„
Robisons Ester $^1/_{1000}$	—	—	—	0·1	—	—	0·1	0·1	—	0·1	—		„
Magnesiumchlorid $^1/_{100}$	—	—	—	—	—	0·1	—	0·1	—	—	—		„
Phosphatpuffer p_H 7·3	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	„
Aqua dest.	0·3	0·2	0·1	0·1	0·1	—	0·1	—	0·2	0·2	0·2		„
Entfärbungszeiten	—	—	13	—	6	6	—	124	—	—	—		Min.

Die Röhrchen, für welche keine Entfärbungszeiten angegeben sind, waren nach 12 Stunden nicht entfärbt.

Versuch 7.

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Taubenmuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Glykogen $^1/_{1000}$	—	0·5	0·5	0·5	—	„
Ad. F. $^1/_{500}$	—	—	0·1	0·1	0·1	„
Magnesiumchlorid $^1/_{1000}$	—	—	—	0·5	—	„
Aqua dest.	1·1	0·6	0·5	—	1·0	„
Entfärbungszeiten	—	—	80	40	—	Min.

Versuchszeit: 2 Stunden.

Versuch 8.

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	—	„
Kaliummalat (1) $^1/_{200}$	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Magnesiumchlorid $^1/_{100}$	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	„
Aqua dest.	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	„
Entfärbungszeiten	14	16	18	20	15	16	28	35	3	4	5	6	Min.

Versuch 9.

Thionin $^1/_{4000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	—	„
Kaliummalat (1) $^1/_{100}$	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Na-Arsenit 0·2 mol.	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	„
Aqua dest.	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	„
Entfärbungszeiten	4	5	6	8	14	24	34	40	7	3	3	3	Min.

Versuch 10.

Thionin $^1/_{4000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel) . .	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	—	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$ . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Na-Arsenat 0·2 mol.	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	„
Aqua dest.	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	„
Entfärbungszeiten . .	4	13	18	30	21	45	—	—	7	3	4	5	Min.

Versuch 11.

Mb $^1/_{5000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Karbonatextrakt (Pferdemuskel) . .	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (2) $^1/_{10}$	0·1	0·1	0·1	0·1	0·1	0·1	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	0·2	—	0·2	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	—	0·2	—	0·2	„
Na-Arsenat m/100	—	0·2	—	—	0·2	0·2	„
Aqua dest.	0·9	0·7	0·7	0·7	0·5	0·5	„
Entfärbungszeiten	120	120	47	19	16	26	Min.

Versuch 12.

Mb $^1/_{5000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co-Zymase (2) $^1/_{10}$	0·1	0·1	0·1	0·1	„
Candiolin $^1/_{1000}$	0·2	—	0·2	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	0·2	—	0·2	„
Phosphatpuffert p_H 7·0 [m/15]	—	—	0·2	0·2	„
Aqua dest.	0·7	0·7	0·5	0·5	„
Entfärbungszeiten	50	27	37	35	Min.

Alle Lösungen kolorimetrisch auf p_H 7 neutralisiert.

Versuch 13.

Thionin $^1/_{4000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel) . .	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$ . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Natriumfluorid 0·01 mol.	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	„
Aqua dest.	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	„
Entfärbungszeiten . .	17	18	18	19	13	13	16	18	3	4	2	2	Min.

Versuch 14.

Thionin $^1/_{4000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	0·3	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Natriumfluorid 0·01 mol.	—	0·1	0·2	0·4	—	0·1	0·2	0·4	„
Aqua dest.	0·4	0·3	0·2	—	0·4	0·3	0·2	—	„
Entfärbungszeiten	32	34	41	43	10	12	11	15	Min.

Versuch 15.

Extrakt A bezeichnet in diesem Versuch einen Phosphatextrakt aus Pferde- oder Taubenmuskulatur, der mit 1 Teil Aqua dest. auf 9 Teile Extrakt versetzt worden ist. Extrakt B ist ein gleichartiger Muskelextrakt, der mit 1prozent. neutralisierter Monobromessigsäurelösung im Verhältnis 1 Teil Monobromessigsäure zu 9 Teilen Extrakt versetzt worden ist. Der so behandelte Extrakt wurde vor Beginn der Versuche 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

a)

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Extrakt A (Taubenmuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	„
Extrakt B (Taubenmuskel)	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	—	0·1	—	—	0·1	0·1	—	0·1	—	—	0·1	0·1		„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	0·2	—	0·2	—	—	—	0·2	—	0·2	—		„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	—	0·2	—	0·2	—	—	—	0·2	—	0·2		„
Phosphatpuffer p_H 7·2	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0		„
Aqua dest.	0·3	0·2	0·1	0·1	—	—	0·3	0·2	0·1	0·1	—	—		„
Entfärbungszeiten	—	40	—	—	4	20	—	—	—	—	—	30		Min.

b)

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Extrakt A (Taubenmuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	„
Extrakt B (Taubenmuskel)	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	—	0·1	—	0·1	—	0·1	—	0·1	„
Kaliummalat (1) $^1/_{200}$	—	—	0·2	0·2	—	—	0·2	0·2	„
Phosphatpuffer p_H 7·2	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	„
Aqua dest.	0·3	0·2	0·1	—	0·3	0·2	0·1	—	„
Entfärbungszeiten	—	60	—	25	—	—	—	32	Min.

c)

Thionin $^1/_{8000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Extrakt A (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	—	—	—	—	—	—	—	„
Extrakt B (Pferdemuskel)	—	—	—	—	—	—	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	—	0·4	—	—	0·4	0·4	—	0·4	—	—	0·4	0·4	—	„
Candiolin $^1/_{1000}$	—	—	0·2	—	0·2	—	—	—	0·2	—	0·2	—	—	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	—	—	0·2	—	0·2	—	—	—	0·2	—	0·2	—	„
Phosphatpuffer p_H 7·2	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	1·0	„
Aqua dest.	0·6	0·2	0·4	0·4	—	—	0·6	0·2	0·4	0·4	—	—	—	„
Entfärbungszeiten	—	68	—	—	3	20	—	—	—	—	52	17	—	Min.

d)

Thionin $^1/_{8000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Extrakt A (Pferdemuskel)	0·5	0·5	—	—	„
Extrakt B (Pferdemuskel)	—	—	0·5	0·5	„
Co. E.	—	0·4	—	0·4	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	0·2	0·2	0·2	0·2	„
Phosphatpuffer p_H 7·2	1·0	1·0	1·0	1·0	„
Aqua dest.	0·4	—	0·4	—	„
Entfärbungszeiten	—	16	—	13	Min.

Versuch 16.

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Kaliummalat (l) $^1/_{800}$	0·5	0·25	—	—	—	—	—	—	—	„
Kaliummalat (l) $^1/_{6400}$	—	—	0·5	0·25	—	—	—	—	—	„
Kaliummalat (dl) $^1/_{400}$	—	—	—	—	0·5	0·25	—	—	—	„
Kaliummalat (dl) $^1/_{3200}$	—	—	—	—	—	—	0·5	0·25	—	„
Aqua dest.	—	0·25	—	0·25	—	0·25	—	0·25	0·5	„
Entfärbungszeiten	26	38	59	72	26	37	58	72	—	Min.

Versuch 17.

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Kaliummalat (l) $^1/_{100}$	0·5	—	0·5	—	—	—	„
Kaliummalat (dl) $^1/_{100}$	—	0·5	—	0·5	—	—	„
Ad. F. $^1/_{1000}$	0·2	0·2	—	—	0·2	—	„
Phosphatpuffer p_H 7·7	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Aqua dest.	—	—	0·2	0·2	0·5	0·7	„
Entfärbungszeiten	14	146	200	200	300	300	Min.

Versuch 18.

Mb $^1/_{10000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Lithiumlaktat (dl) $^1/_{100}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	„
Phosphatpuffer p_H 6·2	1·0	—	—	—	—	„
„ p_H 6·6	—	1·0	—	—	—	„
„ p_H 7·0	—	—	1·0	—	—	„
„ p_H 7·5	—	—	—	1·0	—	„
„ p_H 8·0	—	—	—	—	1·0	„
Entfärbungszeiten	—	32	18	6	4	Min.

Versuch 19.

Mb $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	„
Candiolin $^1/_{1000}$	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	„
Phosphatpuffer p_H 5·6	1·0	—	—	—	—	—	„
„ p_H 6·2	—	1·0	—	—	—	—	„
„ p_H 6·6	—	—	1·0	—	—	—	„
„ p_H 7·0	—	—	—	1·0	—	—	„
„ p_H 7·5	—	—	—	—	1·0	—	„
„ p_H 8·0	—	—	—	—	—	1·0	„
Entfärbungszeiten	—	100	7	4·5	3	2	Min.

Versuch 20.

Thionin $^1/_{15000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Ausgewaschener Froschmuskel	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	0·2	„
Phosphatlösung nach Thunberg	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Kaliumlaktat (dl) $^1/_{100}$	—	0·2	—	—	0·2	—	„
Kaliummalat (l) $^1/_{200}$	—	—	0·2	—	—	0·2	„
Co S. G. $^1/_{2000}$	—	—	—	0·1	0·1	0·1	„
Aqua dest.	0·4	0·2	0·2	0·3	0·1	0·1	„
Entfärbungszeiten	400	300	40	300	70	37	Min.

Versuch 21.

Thionin $^1/_{20000}$	0·5	0·5	0·5	0·5	ccm
Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	0·5	0·5	0·5	0·5	„
Co E.	—	0·5	—	0·5	„
Glutaminsaures Kalium $^1/_{100}$	—	—	0·5	0·5	„
Aqua dest.	1·0	0·5	0·5	—	„
Entfärbungszeiten	—	—	—	37	Min.

Versuch 22.

a)

Drei Probiergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	1·0 ccm
Co-Zymase (1)	0·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	0·5 „

II.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	1·0 ccm
Co-Zymase (1)	0·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	0·5 „
Mb $^1/_{30000}$	4 Tropfen

III.

Wie II.

Extrakt und Reagenzien sind in diesem wie in den folgenden Versuchen (23—27) kolorimetrisch so genau wie möglich auf p_H 7 neutralisiert.

I und II werden im Thermostat bei 37° während 15 Min. unter vollem Luftzutritt gelassen. Danach wird mit gleichen Teilen 10prozent. Trichloressigsäure gefällt. III wird sofort mit Trichloressigsäure gefällt und dient als Kontrolle. Die Bestimmungen von anorganischem und leicht hydrolysierbarem Phosphat werden danach mit je 1·5 ccm vom Filtrate ausgeführt.

Resultat:

	I	II	III
Anorganisches P	0	0	0
Leicht hydrolysierbares P	+	+++	0

b)

Quantitativer Versuch.

Drei Probiergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	3·0 ccm
Co-Zymase	1·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	1·5 „

II.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	3·0 ccm
Co-Zymase	1·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	1·5 „
Mb $^1/_{10000}$	4 Tropfen

III.

Wie II.

I und II werden im Thermostat bei 37° während 15 Min. unter vollem Luftzutritt gelassen. Danach wird mit gleichen Teilen 10prozent. Trichloressigsäure gefällt. III wird sofort mit Trichloressigsäure gefällt und dient als Kontrolle. Die Bestimmungen von anorganischem und leicht hydrolysierbarem Phosphat werden danach mit je 5 ccm vom Filtrate ausgeführt.

Resultat:

	I	II	III
Anorganisches P	0·017	0·014	0·020
Leicht hydrolysierbares P	0·046	0·046	0·030

Die Zahlen geben mg P pro 5 ccm Filtrat an.

Zu diesem Versuch wurde ein von Prof. Myrbäck erhaltenes, nicht genau definiertes Co-Zymasepräparat verwendet, das nicht ganz frei von anorganischem Phosphat war.

Versuch 23.

In ein Probiergläschen:

Karbonatextrakt (Pferdemuskel) (genau neutralisiert)	1·0 ccm
Ad. F. $^{1}/_{100}$	1·0 „

Das Rohr wird im Wasserbad bei 37° 2 Stunden lang stehen gelassen und darauf mit gleichen Teilen 10prozent. Trichloressigsäure gefällt. Ein Kontrollrohr mit gleichem Inhalt wird unmittelbar mit Trichloressigsäure gefällt. Resultate (die Phosphatbestimmung wurde mit je 2 ccm des Filtrates ausgeführt):

	Probe	Kontrolle
Anorganisches P	Spuren	Spuren

Versuch 24.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	1·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg. $^{1}/_{100}$	0·5 „
Aqua dest.	0·5 „

Die Probe wird 2 Stunden bei 37° stehen gelassen und dann mit 1 ccm 20prozent. Trichloressigsäure gefällt. Eine Kontrollprobe von gleicher Zusammensetzung wird unmittelbar mit Trichloressigsäure gefällt. Phosphatbestimmungen werden mit 1·5 ccm des Filtrates gemacht. Resultate:

	Probe	Kontrolle
Anorganisches P.	Spuren	0

Versuch 25.

Drei Probiergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	1·0 ccm
Robisons Ester $^{1}/_{500}$	0·5 „
Co-Zymase (1)	0·5 „

II.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	1·0 ccm
Robisons Ester $^{1}/_{500}$	0·5 „
Co-Zymase (1)	0·5 „
Mb $^{1}/_{30\,000}$	4 Tropfen

III.

Wie II.

Rohr I und II werden im Thermostat bei 37° bei vollem Luftzutritt 15 Min. lang stehen gelassen und darauf mit gleichen Teilen einer 10prozent. Trichloressigsäure gefällt. Rohr III dient als Kontrolle und wird unmittelbar mit Trichloressigsäure gefällt. Bestimmungen von anorganischem und leicht hydrolysierbarem Phosphat werden darauf mit je 1·5 ccm des Filtrates ausgeführt. Resultate:

	I	II	III
Anorganisches P	0	0	0
Leicht hydrolysierbares P . .	Spuren	0	0

Versuch 26.

Ein Karbonatextrakt aus Pferdemuskulatur wird in zwei Portionen geteilt. Die eine Portion wird durch Zusatz eines Teiles einer 1prozent. Monobromacetatlösung auf 9 Teile Extrakt vergiftet (Extrakt A). Die zweite Portion wird mit Wasser im gleichen Verhältnis verdünnt. Zwei Proben werden gemacht:

I.

Extrakt A	1·0 ccm
Co-Zymase (1)	0.5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	0·5 „
Mb $^1/_{30000}$	4 Tropfen

II.

Extrakt B	1·0 ccm
Co-Zymase (1)	0·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	0·5 „
Mb $^1/_{30000}$	4 Tropfen

Die Proben werden bei 37° und vollem Luftzutritt 15 Min. stehen gelassen. Darauf werden sie mit gleichen Teilen 10prozent. Trichloressigsäure gefällt. Bestimmungen von anorganischem und leicht hydrolysierbarem Phosphat werden darauf mit je 1·5 ccm des Filtrates ausgeführt. Resultate:

	I	II
Anorganisches P	0	0
Leicht hydrolysierbares P	0	++

Versuch 27.

Drei Probiergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	3·0 ccm
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	1·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	1·5 „

II.

Karbonatextrakt (Pferdemuskel)	3·0 ccm
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	1·5 „
Candiolin $^1/_{1000}$	1·5 „
Mb $^1/_{10000}$	4 Tropfen

III.

Wie II.

Rohr I und II werden im Thermostat bei 37° und vollem Luftzutritt 15 Min. stehen gelassen. Darauf wird mit der Hälfte 20prozent. Trichloressigsäure gefällt. Rohr III wird unmittelbar mit Trichloressigsäure gefällt und dient als Kontrolle. Bestimmungen von anorganischem und leicht hydrolysierbarem Phosphat werden darauf mit je 3·5 ccm des Filtrates ausgeführt. Resultate:

	I	II	III
Anorganisches P	Spuren	Spuren	Spuren
Leicht hydrolysierbares P	(+)	(+)	(+)

Versuch 28.

Drei Bechergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	13·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg (2 Proz.)	7·0 „
Co-Zymase (2)	0·1 „
Aqua dest.	5·0 „

II.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	13·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg (2 Proz.)	7·0 „
Co-Zymase (2)	0·1 „
Aqua dest.	5·0 „
Mb $^1/_{1000}$	5 Tropfen

III.

Wie I.

III wird unmittelbar mit 5 ccm 20prozent. Trichloressigsäure gefällt. I und II werden 3 Stunden bei 37° stehen gelassen und darauf in gleicher Weise wie Rohr III gefällt. Nach dem Fällen werden die Proben filtriert und 25 ccm vom Filtrate jeder Probe aufgesammelt. Die Filtrate werden mit 1 ccm einer 20prozent. Magnesiumchloridlösung und 3 ccm Ammoniak, sowie Wasser bis zu 50 ccm versetzt. Sie werden im Eisschrank über Nacht stehen gelassen, so daß der entstandene Phosphatniederschlag sich absetzen kann. Am nächsten Tag wird nach Zusatz einer Messerspitze gut ausgewaschener Tierkohle filtriert. Die Proben werden darauf mit Schwefelsäure lackmusneutral gemacht und mit Wasser so kompensiert, daß die zugesetzte Flüssigkeitsmenge in sämtlichen Fällen gleich groß wird. Freier P wird in sämtlichen Proben bestimmt, teils unmittelbar, teils nach Kochen mit Schwefelsäure während 15, 30, 90 und 180 Min. (siehe S. 61). Schließlich wird auch eine Bestimmung des gesamten säurelöslichen P.s ausgeführt. Hierdurch erhält man Garantie dafür, dafür, daß keine Hexosediphosphorsäure durch hydrolytische Spaltung verloren gegangen ist. In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen

Werte zusammengestellt. Die Zahlen bezeichnen Milligramm P per Kubikzentimeter.

	I	II	III
0 Min.	0	+	0
15 Min.	0·039	0·040	0·033
30 Min.	0·070	0·071	0·061
90 Min.	0·090	0·096	0·100
180 Min.	0·100	0·106	0·123
Totale P	0·240	0·230	0·230

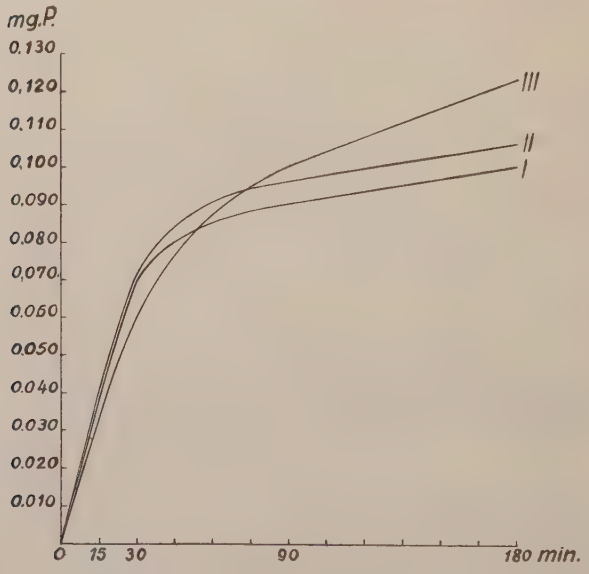


Fig. 1.

Versuch 29.

Drei Bechergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	13·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg (2 Proz.)	5·0 „
Aqua dest.	2·0 „
Co-Zymase (2)	0·1 „

II.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	13·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg (2 Proz.)	5·0 „
Aqua dest.	2·0 „
Co-Zymase (2)	0·1 „
Mb $^{1}/_{1000}$	1 Tropfen

III.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	13·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Mg (2 Proz.)	5·0 „
Aqua dest.	2·0 „

III wird unmittelbar mit 5 ccm 20prozent. Trichloressigsäure gefällt, I und II werden 3 Stunden bei 37° stehen gelassen. I wird während dieser Zeit in einer evakuierten Saugflasche aufbewahrt. Die Proben werden darauf in gleicher Weise wie im vorigen Versuch behandelt. Die folgende Tabelle enthält die bei der Säurehydrolyse erhaltenen Phosphorsäurewerte.

	I	II	III
0 Min.	0·008	0·006	0·011
15 Min.	0·020	0·021	0·038
30 Min.	0·033	—	0·053
90 Min.	0·050	0·060	0·082
180 Min.	0·062	0·068	0·110
Totale P	0·190	0·180	0·200
Total Ester P	0·182	0·174	0·189

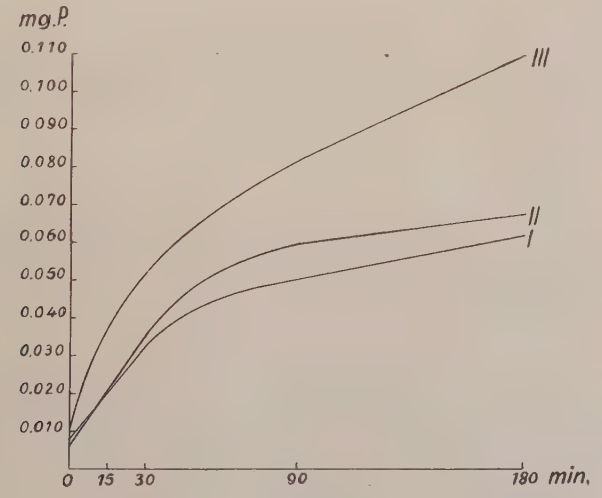


Fig. 2.

Versuch 30.

Drei Bechergläser werden folgendermaßen beschickt:

I.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	15·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Kalium (ungefähr 2 Proz.)	7·0 „
Magnesiumchlorid (10prozent.)	0·1 „
Aqua dest.	1·0 „

II.

Phosphatextrakt (Pferdemuskel)	15·0 ccm
Hexosediphosphorsaures Kalium (ungefähr 2 Proz.)	7·0 „
Magnesiumchlorid (10prozent.)	0·1 „
Aqua dest.	1·0 „
Muskeladenylsäure $^1/_{500}$	1·0 „

III.

Wie I.

III wird unmittelbar mit 5 ccm 20prozent. Trichloressigsäure gefällt. I und II werden 3 Stunden bei 37° stehen gelassen. Die Proben werden darauf in gleicher Weise wie im vorigen Versuch behandelt. Die folgende Tabelle enthält die bei der Säurehydrolyse erhaltenen Phosphorsäurewerte.

	I	II	III
0 Min.	0	0	0
15 Min.	0·023	0·023	0·025
30 Min.	0·046	0·044	0·045
90 Min.	0.049	0·051	0·046
180 Min.	0·054	0·054	0·054
Totale P	0·100	0·121[1]	0·100

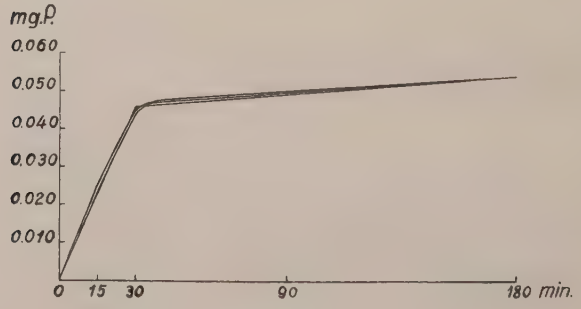


Fig. 3.

Versuch 31.

Dieser Versuch, der die Spontandehydrierung von Methylglyoxal bei Gegenwart von Mb bei verschiedenen p_H zeigen soll, ist mit einer Methylglyoxallösung ausgeführt worden, die aus Isonitrosoaceton nach Hofmann und Neuberg (1) dargestellt worden ist. Ihr Gehalt an Methylglyoxal ist jodometrisch bestimmt worden. Der Versuch ist als ein gewöhnlicher Mb-Versuch ausgeführt worden.

[1] Diese Zahl ist um einige Einheiten in der letzten Dezimale zu groß, da der P-Gehalt der zugesetzten Adenylsäure mit eingerechnet ist.

Mb $^1/_{15000}$		0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	ccm
Methylglyoxal 0·96/1000		0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	0·25	„
Phosphatpuffer	p_H 7·7	1·0	—	—	—	—	—	—	—	—	„
„	p_H 7·3	—	1·0	—	—	—	—	—	—	—	„
„	p_H 7·2	—	—	1·0	—	—	—	—	—	—	„
„	p_H 7·0	—	—	—	1·0	—	—	—	—	—	„
„	p_H 6·8	—	—	—	—	1·0	—	—	—	—	„
„	p_H 6·6	—	—	—	—	—	1·0	—	—	—	„
„	p_H 6·2	—	—	—	—	—	—	1·0	—	—	„
„	p_H 5·9	—	—	—	—	—	—	—	1·0	—	„
„	p_H 5·6	—	—	—	—	—	—	—	—	1·0	„
Entfärbungszeiten . . .		0·5	1·0	1·5	3·0	4·5	6·0	10·0	15·0	29·0	Min.

Literatur.

Ahlgren, G., Zur Kenntnis der tierischen Gewebsoxydation, sowie ihrer Beeinflussung durch Insulin, Adrenalin, Thyroxin und Hypophysepräparate. *Skand. Arch. f. Physiol.* 1925. Bd. XLVII. Suppl.

Andersson, B., Über Hexosediphosphatdehydrogenase und Carboxylase in Pflanzensamen. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1932. Bd. CCX. S. 15.

Derselbe, Über Co-Zymaseaktivierung einiger Dehydrogenasen. *Ebenda.* 1933. Bd. CCXVII. S. 186.

Auhagen, E., Co-Carboxylase, ein neues Co-Enzym der alkoholischen Gärung. *Ebenda.* 1932. Bd. CCIV. S. 149.

Banga, I., Schneider, L. und Szent-Györgyi, Über den Einfluß der arsenigen Säure auf die Gewebsatmung. *Biochem. Zeitschr.* 1931. Bd. CCXL. S. 462.

Dieselben, Über die Bedeutung der Milchsäure für die Atmung des zerkleinerten Herzmuskelgewebes. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXL. S. 478.

Banga, I. und Szent-Györgyi, Über Co-Fermente, Wasserstoffdonatoren und Arsenvergiftung der Zellatmung. *Ebenda.* 1932. Bd. CCXLVI. S. 203.

Dieselben, Über Atmungs-Co-Ferment und Adenylpyrophosphorsäure. *Ebenda.* 1932. Bd. CCXLVII. S. 216.

Banga, I., Szent-Györgyi, A. und Vargha, L., Über das Co-Ferment der Milchsäureoxydation. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1932. Bd. CCX. S. 228.

Barrenscheen, H. K. und Braun, K., Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. IV. Mitt. Die Aktivierung der Aldehyddismutation. *Biochem. Zeitschr.* 1932. Bd. CCLIII. S. 414.

Barrenscheen, H. K., Braun, K. und Dreguss, M., Glykolysehemmung und Methylglyoxalschwund. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXL. S. 381.

Barrenscheen, H. K., Braun, K. und Filz, W., Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. VI. Mitt. *Ebenda.* 1933. Bd. CCLXV. S. 141.

Barrenscheen, H. K. und Filz, W., Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. I. Mitt. Glykolysehemmung und Ammoniakabspaltung. *Biochem. Zeitschr.* 1931. Bd. CCXL. S. 409.

Dieselben, Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. II. Mitt. Zur Chemie der Adenosintriphosphorsäure. *Ebenda.* 1932. Bd. CCL. S. 281.

Dieselben, Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. V. Mitt. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLIII. S. 422.

Barrenscheen, H. K. und Lang, S., Zur Kenntnis der Adenosintriphosphorsäurephosphatase der Leber. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLIII. S. 395.

Barrenscheen, H. K. und Müller, K., Untersuchungen zur Frage der Co-Fermentwirkung. III. Mitt. Die Aktivierung der Milchsäurebildung im Muskelextrakt durch die verschiedenen Formen der Adenosintriphosphorsäure. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLIII. S. 408.

Briggs, A. P., A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *Journ. of biol. chem.* 1932. Vol. LIII. p. 13—16.

Buchner, E., Alkoholische Gärung ohne Hefezellen *Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch.* 1897. Bd. XXX. S. 117.

Buchner, E. und Rapp, R., Alkoholische Gärung ohne Hefezellen *Ebenda.* 1897. Bd. XXX. S. 2668.

Case, E. M. and Cook, R. P., The Occurence of Pyruvic acid and Methylglyoxal in Muscle Metabolism. *Biochem. Journal.* 1931. Vol. XXV. p. 1319.

Clark, A. J., Gaddie, R and Stewart, C. P., The Carbohydrate Metabolism of the Isolated Heart of the Frog. *Journ. of Physiol.* 1932. Vol. LXXV. p 311—320.

Deuticke, H. J., Über die Einwirkung von Adenosinmonophosphorsäuren und Adenosintriphosphorsäure auf Dehydrierungsvorgänge durch pflanzliche und tierische Fermente. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1930. Bd. CXCII. S. 193.

Dudley, H. W., Intermediate carbohydrate metabolism. The effect of sodium iodoacetate on glyoxalase. *Biochem. Journ.* 1931. Vol. XXV. p. 439.

Erdtmann, H., Über Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. II. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1928. Bd. CLXXVII. S. 211.

Derselbe, Über Nierenphosphatase. III. *Ebenda.* 1928. Bd. CLXXVII. S. 231.

Embden, G., Deuticke, H. J. und Kraft, G., Über die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Klinische Wochenschrift.* 1933. Bd. XII. S. 213.

Embden, G., Griesbach, W. und Schmitz, E., Über Milchsäurebildung und Phosphorsäurebildung im Muskelpreßsaft. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1914. Bd. XCIII. S. 1.

Embden, G. und Zimmermann, M., Über die Chemie des Lactacidogens. IV. Mitt. *Ebenda.* 1924. Bd. CXLI. S. 225.

Dieselben, Über die Chemie des Lactacidogens. V. Mitt. *Ebenda.* 1926. Bd. CLXVII. S. 114.

Von Euler, H. und Myrbäck, K., Zur Kenntnis der Trockenhefe. *Ebenda.* 1921. Bd. CXVII. S. 28.

Dieselben, Über die Beteiligung der Co-Zymase am Zuckerabbau. *Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch.* 1924. Bd. LVII. Nr. 7. S. 1073.

Dieselben, Gärungs-Co-Enzym (Co-Zymase) der Hefe. V. Über die Aufgabe der Co-Zymase bei der Gärung. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1924. Bd. CXXXIX. S. 15.

Dieselben, Zur Kenntnis der enzymatischen Umwandlungen der Aldehyde. III. *Ebenda.* 1927. Bd. CLXV. S. 28.

Dieselben, Bildung und Zerfall der Hexosediphosphorsäure bei der alkoholischen Gärung. *Ebenda.* 1927. Bd. CLXVII. S. 236.

Dieselben, Co-Zymase. XIV. *Ebenda.* 1927. Bd. CLXIX. S. 102.

Dieselben, Co-Zymase. XV. *Ebenda.* 1928. Bd. CLXXVII. S. 237.

Dieselben, Co-Zymase. XVI. *Ebenda.* 1929. Bd. CLXXXIV. S. 163.

Dieselben, Co-Zymase und Adenylsäure. *Ebenda.* 1931. Bd. CXCIX. S. 189.

Von Euler, H. und Nilsson, R., Zur Kenntnis der Reduktase (Dehydrogenase der Hefe). *Ebenda.* 1925. Bd. CXLIX. S. 44.

Dieselben, Beitrag zur Kenntnis der Co-Zymase und der Co-Reduktase. *Ebenda.* 1926. Bd. CLX. S. 234.

Dieselben, Zur Kenntnis der Reduktase (Dehydrogenase) der Hefe. V. *Ebenda.* 1926. Bd. CLXII. S. 72.

Dieselben, Über spezifische Aktivatoren des enzymatischen Kohlenhydratabbaues. *Arkiv f. kemi, mineralogi och geologi.* 1931. Bd. X. B. Nr. 14.

Dieselben, Zur Kenntnis der Kohlenhydratredoxase. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1931. Bd. CXCIV. S. 260.

Dieselben, Adenosintriphosphorsäure und Co-Zymase. *Ebenda.* 1932. Bd. CCVIII. S. 173.

Von Euler, H., Nilsson, R. und Auhagen, E., Über die Funktion des Magnesiums beim enzymatischen Kohlenhydratabbau. *Ebenda.* 1931. Bd. CC. S.1.

Von Euler, H., Nilsson, R. und Runeberg, D., Über die biologischen Abbau- und Veratmungsvorgänge an verschiedenen Stoffgruppen. *Ebenda.* 1927. Bd. CLXIX. S. 123.

Fiske, C. H. und Subbarow, Y., Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science.* 1929. Vol. II. p. 381.

Haarmann, W., Über den Einfluß von Monobromacetat auf den Kohlenhydratstoffwechsel und über den anaeroben Milchsäureschwund. *Biochem. Zeitschr.* 1932. Bd. CCLVI. S. 326.

Hahn, A. und Fischbach, E., Über die Oxydation der Milchsäure im Muskel. *Zeitschr. f. Biol.* 1929. Bd. LXXXIX. S. 149.

Hahn, A. und Haarmann, W., Über die Dehydrierung der Apfelsäure. I. Mitt. *Ebenda.* 1928. Bd. LXXXVII. S. 465.

Dieselben, Über die Dehydrierung der Apfelsäure. (Vorl. Mitt.) *Ebenda.* 1929. Bd. LXXXVIII. S. 91.

Dieselben, Über den Abbau von Fruktosediphosphorsäure, Glyzerinphosphorsäure und Propionsäure im Muskel. *Ebenda.* 1930. Bd. XC. S. 231.

Hahn, A., Haarmann, W. und Fischbach, E., Über die Dehydrierung der Apfelsäure. II. Mitt. *Ebenda.* 1929. Bd. LXXXVIII. S. 587.

Harden, A., *Alcoholic Fermentation.* London 1923.

Derselbe, Alcoholic Fermentation. The Early Stages of Fermentation. Fermentation in the Yeast Cell. *Ergebnisse der Enzymforschung.* Leipzig. 1932. Bd. I. S. 113.

Harden, A. und Robison, R., A new phosphoric ester obtained by the aid of yeast-juice. *Proc. Chem. Coc.* 1914. Vol. XXX. p. 16.

Harden, A. and Young, W. J., The influence of phosphates on the fermentation of glucose by yeast-juice. *Ibidem.* 1905. Vol. XXI. p. 189.

Dieselben, The Alcoholic ferment of yeast-juice. *J. Physiol.* 1905. Vol. XXXII. Proceedings of 12. November 1904.

Harden, A. and Young, W. J., Influence of sodium arsenate on the fermentation of glucose by yeast-juice. *Proc. Chem. Soc.* 1906. Vol. XXII. p. 283.

Dieselben, The alcoholic ferment of yeast-juice. Part V. The function of phosphates in alcoholic fermentation. *Ibidem.* 1910. Vol. LXXXII. p. 321.

Dieselben, The alcoholic fermentation of yeast-juice. Part VI. The effect of arsenates and arsenites on the fermentation of the sugars by yeast-juice. *Ibidem.* 1911. Vol. LXXXIII. p. 451.

Hofmann, E. und Neuberg, C., Weiteres über einfache Gewinnung von Methylglyoxallösungen. *Biochem. Zeitschr.* 1930. Bd. CCXXVI. S. 489.

Holmberg, C. G., Zur Kenntnis der physiologischen Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure. *Kungl. Fysiograf. Sällskap. i Lund Förhandl.* 1932. Bd. II. Nr. 5.

Derselbe, Zur Kenntnis der Adenosintriphosphorsäure laut Fiske als Co-Enzym bei gewissen Dehydrierungsprozessen, nebst Beschreibung einer Methode zur Darstellung eines hochaktiven Co-Enzympräparat aus Erbsen. *Ebenda.* 1932. Bd. II. Nr. 7.

Derselbe, Einige vergleichende Versuche über die Donatorwirkung der Adenosintriphosphorsäure und der Co-Zymase gegenüber den Enzymen gewisser Pflanzensamen. *Skand. Archiv f. Physiol.* 1932. Bd. LXIV. S. 177.

Derselbe, Zur Kenntnis der Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure, der Co-Zymase und der Hexosediphosphorsäure für den Kohlenhydratstoffwechsel des Muskels. *Kungl. Fysiograf. Sällskap. i Lund Förhandl.* 1933. Bd. III. Nr. 8.

Derselbe, Zur Kenntnis der Nukleinsäureumsetzung in Leberextrakt. *Ebenda.* 1933. Bd. III. Nr. 9.

Jacobsen, E., *Om Organismens Fosfatavspaltende Enzymer.* Dissertation. Kopenhagen. 1933.

Klimek, R. und Parnas, J. K., Adenylsäure und Adeninnukleotid. *Biochem. Zeitschr.* 1932. Bd. CCLII. S. 392.

Kluyver, A. J. und Struyk, A. P., Die Rolle der Phosphate bei der Dissimilation der Hexosen. *Verslag. d. afdel. natuurkunde konikl. aka. v. wetensch.* Amsterdam. 1926. Bd. XXXV. Nr. 1. S. 177.

Dieselben, Die ersten Phasen des Chemismus der Dissimilation der Hexosen. *Ebenda.* Amsterdam. 1927. Bd. XXXVI. Nr. 6. S. 608.

Dieselben, Über das sogenannte Co-Enzym der alkoholischen Gärung. Ein Versuch zu einer synthetischen Betrachtung des Co-Enzymproblems auf experimenteller Grundlage. *Biochem. Zeitschr.* 1928. Bd. CCI. S. 212.

Krebs, H. A., Über die Wirkung der Monojodessigsäure auf den Zellstoffwechsel. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXXXIV. S. 278.

Von Lebedev, A., Extraction de la zymase par simple macération. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 1911. Vol. CLII. p. 49.

Lehnartz, E., Über Verknüpfung des Aufbaus und Abbaus von Tätigkeitssubstanzen des Muskels. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1929. Bd. CLXXXIV. S. 1.

Lipmann, F., Versuche zum Mechanismus der Fluoridwirkung. *Biochem. Zeitschr.* 1928. Bd. CXCVI. S. 3.

Derselbe, Weitere Versuche über den Mechanismus der Fluoridhemmung und die Dissoziationskurve des Fluorhämoglobins. *Ebenda.* 1929. Bd. CXCVI. S. 171.

Derselbe, Über die oxydative Hemmbarkeit der Glykolyse und den Mechanismus der Pasteurschen Reaktion. *Ebenda.* 1933. Bd. CCLXV. S. 133.

Lipmann, F. und Lohmann, K., Über die Umwandlung der Harden-Youngschen Hexosediphosphorsäure und die Bildung von Kohlenhydrat-phosphorsäureestern in Froschmuskelextrakt. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXXII. S 389.

Lohmann, Über das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. I. Nachweis und Isolierung des Pyrophosphats. *Ebenda.* 1928. Bd. CCII. S. 466.

Derselbe, Über die Bildung und Aufspaltung von Phosphorsäureestern in der Muskulatur in Gegenwart von Fluorid, Oxalat, Citrat und Arseniat. I. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXXII. S. 324.

Derselbe, Über das Co-Ferment der Milchsäurebildung des Muskels. *Naturwiss.* 1931. Bd. XIX. S. 180.

Derselbe, Untersuchungen über die Vergiftung von Froschmuskelextrakt mit Monojodacetat. *Biochem. Zeitschr.* 1931. Bd. CCXXXVI. S. 444.

Derselbe, Untersuchungen über die chemische Natur des Co-Ferments der Milchsäurebildung. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXXXVII. S. 445.

Derselbe, Der Einfluß des Co-Ferments der Milchsäurebildung auf die Aufspaltung von Kohlenhydratphosphorsäureestern im Muskelextrakt. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXLI. S. 50.

Derselbe, Vergleichende Untersuchungen über das Co-Ferment der Milchsäurebildung und der alkoholischen Gärung. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXLI. S. 67.

Derselbe, Beitrag zur enzymatischen Umwandlung von synthetischem Methylglyoxal in Milchsäure. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLIV. S. 332.

Derselbe, Untersuchungen zur Konstitution der Adenylpyrophosphorsäure. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLIV. S. 381.

Derselbe, Zuckerabbau in der tierischen Zelle. Artikel im „*Handbuch der Biochemie*", Ergänzungswerk. Bd. I. Jena. 1933.

Lundsgaard, E., Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Biochem. Zeitschr.* 1930. Bd. CCXVII. S. 162.

Derselbe, Die Monojodessigsäurewirkung auf die enzymatische Kohlenhydratspaltung. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXX. S. 1.

Derselbe, Über die Einwirkung der Monojodessigsäure auf den Spaltungs- und Oxydationsstoffwechsel. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXX. S. 8.

Derselbe, Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXXVII. S. 51.

Derselbe, Weitere Untersuchungen über die Einwirkung der Halogenessigsäuren auf den Spaltungs- und Oxydationsstoffwechsel. *Ebenda.* 1932. Bd. CCL. S. 61.

Macfarlane, M. G., The action of arsenate on hexosephosphatase. *Biochem. Journal.* 1930. Vol. XXIV. p. 1051.

Mawson, G. A., The lactic acid metabolism of frogs muscle poisoned with iodoacetic acid. I. The lactic acid metabolism of anaerobic iodoacetate muscle. II. The lactic acid metabolism of aerobic iodoacetate muscle. *Journal of Physiol* 1932 Vol. LXXV. p. 201.

Derselbe, The Re-synthesis of Creatinephosphoric Acid in Frog's Muscle poisoned with Iodoacetic Acid. *Ibidem.* 1933. Vol. LXXVIII. p. 295.

Meyerhof, O., Über das Vorkommen des Co-Ferments der alkoholischen Hefegärung im Muskelgewebe und seine mutmaßliche Bedeutung im Atmungsmechanismus. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1918. Bd. CI. S. 165.

Derselbe, Über das Gärungscoferment im Tierkörper. 2. Mitt. *Ebenda.* 1918. Bd. CII. S. 1.

Meyerhof, O., Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. III. Die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen. *Biochem. Zeitschr.* 1927. Bd. CLXXXIII. S. 176.

Derselbe, *Die chemischen Vorgänge im Muskel.* Berlin. 1930.

Derselbe, Intermediate Products and the Last Stages of Carbohydrate Breakdown in the Metabolism of Muscle and the Alcoholic Fermentation. *Nature.* 1933. Vol. CXXXII. pp. 340 and 373.

Meyerhof, O. und Boyland, Über den Atmungsvorgang jodessigsäurevergifteter Muskeln. *Biochem. Zeitschr.* 1931. Bd. CCXXXVII. S. 406.

Meyerhof, O., Gemmill, Ch. L. und Benetato, G., Über den isometrischen Koeffizient des Sauerstoffs normaler und jodessigsäurevergifteter Muskeln. *Ebenda.* 1933. Bd. CCLVIII. S. 371.

Meyerhof, O. und Kiessling, W., Zwischenprodukte des Kohlenhydratumsatzes im Muskelextrakt. *Naturwissenschaften.* 1933. Bd. XXI. S. 223.

Meyerhof, O. und Lohmann, K., Über die Energetik der anaeroben Phosphagensynthese („Kreatinphosphorsäure") im Muskelextrakt. *Ebenda.* 1931. Bd. XIX. S. 575.

Dieselben, Über das Co-Fermentsystem der Milchsäurebildung. *Ebenda.* 1932. Bd. XX. S. 387.

Dieselben, Über energetische Wechselbeziehungen zwischen dem Umsatz der Phosphorsäureester im Muskelextrakt. *Biochem. Zeitschr.* 1932. Bd. CCLIII. S. 431.

Meyerhof, O., Lohmann, K. und Meyer, K., Über das Co-Ferment der Milchsäurebildung im Muskel. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXXXVII. S. 437.

Meyerhof, O. und McEachern, D., Über anaerobe Bildung und Schwund von Brenztraubensäure in der Muskulatur. *Ebenda.* 1933. Bd. CCLX. S. 417.

Morgan, W. T. J., The chemistry of hexosediphosphoric acid. Part. I. The α- and β-methylhexosediphosphoric acids. *Biochem. J.* 1927. Vol. XXI. p. 675.

Derselbe, Constitution of hexosediphosphoric acid. *Chem. Ind.* 1929. Vol. XLVIII. p. 144.

Myrbäck, K., Co-Zymase. *Ergebnisse der Enzymforschung.* Leipzig. 1933. Bd. II. S. 139.

Myrbäck, K. und von Euler, H., Über Eigenschaften hochgereinigter Co-Zymasepräparate. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1931. Bd. CXCVIII. S. 236.

Dieselben, Über die chemische Natur der Co-Zymase. *Ebenda.* 1931. Bd. CCIII. S. 143.

Myrbäck, K., von Euler, H. und Hellström, H., Weitere Untersuchungen über die Hefen-Co-Zymase. *Ebenda.* 1932. Bd. CCXII. S. 7.

Dieselben, Nachtrag zur Mitteilung „Weitere Untersuchungen . . .". *Ebenda.* 1933. Bd. CCXIV. S. 184.

Myrbäck, K. und Jacoby, W., Zur Kenntnis der enzymatischen Umwandlungen der Aldehyde. II. *Ebenda.* 1926. Bd. CLXI. S. 245.

Neuberg, C., Über die Zersetzung von Milchsäurealdehyd und Methylglyoxal durch tierische Organe. *Biochem. Zeitschr.* 1913. Bd. XLIX. S. 502.

Derselbe, Überführung der Fruktosediphosphorsäure in Fruktosemonophosphorsäure. *Ebenda.* 1918. Bd. LXXXVIII. S. 432.

Neuberg, G. und von Euler, H., Zur Nomenklatur der an der alkoholischen Gärung beteiligten Katalysatoren. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXL. S. 245.

Neuberg, C. und Kobel, M., Vergleichende Versuche über die zellfreie Vergärung von Hexosediphosphorsäure, Glukose, Fruktose, Saccharose, sowie Invertzucker. *Ebenda.* 1925. Bd. CLXVI. S. 488.

Dieselben, Fortgesetzte vergleichende Versuche über die Vergärbarkeit freier und phosphorylierter Hexosen und über eine polarimetrisch feststellbare Bindung dieser Substanzen an Inhaltsstoffe der Hefenzelle. *Ebenda.* 1926. Bd. CLXXIX. S. 451.

Dieselben, Die desmolytische Bildung von Methylglyoxal durch Hefenenzym. *Ebenda.* 1928. Bd. CCIII. S. 463.

Dieselben, Phosphorylierung und alkoholische Zuckerspaltung. Liebigs *Ann. d. Chemie.* 1928. Bd. CDLXV. S. 273.

Dieselben, Die Bildung von Brenztraubensäure als Durchgangsglied bei der alkoholischen Zuckerspaltung. Ihre Isolierung als Hauptprodukt der Gärung. *Biochem. Zeitschr.* 1929. Bd. CCXVI. S. 493.

Dieselben, Über die Oxydation des Methylglyoxals zu Brenztraubensäure mit molekularem Sauerstoff. *Ebenda.* 1932. Bd. CCLII. S. 215.

Dieselben, Überführung der synthetischen Glyzerinsäure-mono-phosphorsäure in Brenztraubensäure mittels Hefe und Milchsäurebakterien. *Ebenda.* 1933. Bd. CCLX. S. 241.

Neuberg, C und Leibowitz, J., Untersuchungen über das durch Gärung gewonnene Hexosemonophosphat. *Ebenda* 1927. Bd. CLXXXIV. S. 489.

Dieselben, Arsenataktivierung und die Spezifität von Phosphatase. *Ebenda.* 1927. Bd. CXCI. S. 460.

Neuberg, C. und Reinfurth, E., Die Festlegung der Aldehydstufe bei der alkoholischen Gärung. *Ebenda.* 1918. Bd. LXXXIX. S. 365.

Nilsson, R., Studien über den enzymatischen Kohlenhydratabbau. *Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi.* 1930. Bd. X. A. Nr. 7.

Derselbe, Einige Betrachtungen über den glykolytischen Kohlenhydratabbau. *Biochem. Zeitschr.* 1933. Bd. CCLVIII. S. 198.

Nilsson, R. und von Euler, H., Co-Zymase und Adenosintriphosphat. Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 1932. Bd. CCIV. S. 204.

Ohle, H., *Die Chemie der Monosaccharide und der Glykolyse.* München. 1931.

Quastel, J. H. und Wheatley, A. H. M., The relation of thiol compounds to glucose fermentation. *Biochemical Journal.* 1932. Vol. XXVI. p. 2169.

Robison, R., A new phosphoric ester produced by the action of yeast-juice on hexose. *Ibidem.* 1922. Vol. XVI. S. 809.

Robison, R. and King, E. J., Hexosemonophosphoric ester. *Chem. Ind.* 1929. Vol. XLVIII. p. 143.

Dieselben, Hexosemonophosphoric esters. *Biochemical Journal.* 1931. Vol. XXV. p. 323.

Robison, R. and Morgan, W. T. J., Trehalosemonophosphoric ester isolated from the products of fermentation of sugars with dried yest. *Ibidem.* 1928. Vol. XXII. p. 1277.

Dieselben, The phosphoric esters of alcoholic fermentation. *Ibidem.* 1930. Vol. XXIV. p. 119.

Stern, L., *Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge im Tierorganismus.* Jena. 1914.

Struyk, A. P., *Onderzoekningen over de alcoholische gisting.* Dissertation. Delft. 1928.

Szent-Györgyi, A., Zellatmung. II. Mitt. *Biochem. Zeitschr.* 1925. Bd. CLVII. S. 50.

Szent-Györgyi, A., Zellatmung. III. Mitt. *Biochem. Zeitschr.* 1925. Bd. CLVII. S. 67.

Derselbe, The Action of Arsenite on Tissue Respitation. *Biochem. Journal.* 1930. Vol. XXIV. p. 1723.

Thunberg, T., Die Rolle der Sulfhydrylgruppe bei der Umwandlung des Jodoforms innerhalb des Organismus. *Skand. Archiv f. Physiol.* 1911. Bd. XXV. S. 343.

Derselbe, Über das Vorkommen einer Hexose-Diphosphorsäure-Dehydrogenase in Pflanzensamen. Zugleich ein Beitrag zur Frage, ob die Hexose-Diphosphorsäure eine „Stabilisierungsform" der Hexosen ist. *Lunds Universitets Årsskrift.* 1929. N. F. Avd. 2. Bd. XXV.

Derselbe, Acceptormethode, Dehydrasen der Karbonsäuren, Redoxpotentiale. Oppenheimer, C., *Die Fermente und ihre Wirkungen.* Leipzig. 1929. Bd. III. S. 1118.

Derselbe, Über das Vorkommen einer auf Adenosintriphosphorsäure eingestellten Dehydrogenase in Pflanzensamen. *Lunds Universitets Årsskrift.* 1931. N. F. Avd. 2. Bd. XXVII.

Derselbe, Zur Kenntnis der Spezifität der Dehydrogenasen. *Biochem. Zeitschr.* 1933. Bd. CCLVIII. S. 48.

Warburg, O. und Christian, W., Über Aktivierung der Robisonschen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXLII. S. 206.

Veibel, S., Über die Vorgänge bei der Phosphorylierung von Zucker durch Hefe, insbesondere über die Veränderungen während der Periode der totalen Phosphorylierung. *Ebenda.* 1931. Bd. CCXXXIX. S. 350.

Yamasaki, I., Über die Wirkung von monojodessigsaurem Natrium auf die Teilfermente der Zymase und die Vergärung von Hexose-diphosphat. *Ebenda.* 1930. Bd. CCXXVIII. S. 123.

Young, W. J., The hexosephosphate formed by yeast-juice from hexose and phosphate. *Proc. Roy. Soc.* 1909. Vol. LXXXI. p. 528.

DRUCK VON METZGER & WITTIG IN LEIPZIG